

Dissertation

# **Modulation zellulärer Signalwege und antiviraler Mechanismen in Makrophagen durch Orthopockenviren**

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**M. Sc. Daniel René Bourquain**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter:   1. Prof. Dr. Detlev H. Krüger  
                  2. PD Dr. Andreas Nitsche  
                  3. Prof. Dr. Gerd Sutter

Tag der mündlichen Prüfung: 09.04.2013

*"I never guess. It is a capital mistake to theorize before one has data. Insensibly one begins to twist facts to suit theories, instead of theories to suit facts."*

Sir Arthur Conan Doyle (Sherlock Holmes),  
*The Sign of Four, A Scandal in Bohemia*

## Zusammenfassung

Nach der Eradikation der humanen Pockenerkrankung und ihres Erregers, des Variola Virus, stellen zoonotische Orthopockenvirus-(OPV-)Infektionen heute eine mögliche Bedrohung der öffentlichen Gesundheit dar. Hierbei sind insbesondere Kuhpocken- (CPXV), Affenpocken- (MPXV) und Vaccinia Viren (VACV) von Bedeutung. Diese Viren unterscheiden sich bezüglich ihres Wirtsspektrums und ihrer Pathogenität im Menschen, was zum Teil durch ihr individuelles Repertoire an immunmodulatorischen Proteinen bedingt ist. In dieser Arbeit wurde das Genexpressionsprofil humaner (HeLa) Zellen nach Infektion mit CPXV, MPXV oder VACV untersucht. Es wurden sowohl zelluläre Gene identifiziert, welche generell von allen verwendeten Viren reguliert wurden, als auch Gene, die eine Virus-spezifische Regulation durch individuelle OPV aufwiesen. Gemeinsamkeiten zeigten sich insbesondere zwischen CPXV und MPXV, welche, im Gegensatz zu VACV, die Expression zahlreicher Cytokine und Chemokine induzierten. Die Folgen dieser Cytokin-Induktion wurden am Beispiel von CPXV weiter analysiert. Insbesondere für Interleukin-6, -8 und CXCL1 konnte auch auf Proteinebene eine gesteigerte Sekretion durch CPXV-infizierte Zellen nachgewiesen werden. Vermutlich aufgrund dieser Induktion, trat *in vitro* eine verstärkte Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen in Folge einer CPXV-, nicht aber einer VACV-Infektion auf. Makrophagen spielen eine kontroverse Rolle im Rahmen einer OPV-Infektion und sind sowohl für deren Bekämpfung, als auch, im infizierten Zustand, für die Ausbreitung der Viren im Organismus von Bedeutung. Daher wurde im Folgenden die Replikationsfähigkeit von CPXV und VACV in Makrophagen charakterisiert. Dabei konnte der Virulenzfaktor p28, welcher von den meisten VACV Stämmen nicht kodiert wird, als essentiell für die Replikation von CPXV in einer murinen Makrophagen-Zelllinie, primären peritonealen Makrophagen der Ratte und in Makrophagen aus primären humanen PBMCs identifiziert werden. Hierzu wurden rekombinante CPXV mit einem *knockout* oder einer funktionellen Mutation des p28 Gens untersucht. In Abwesenheit von p28 wurde das anti-apoptotische zelluläre Bcl-xL Protein in infizierten Zellen rasch degradiert, was jedoch nicht in der Apoptose der Zelle resultierte. Die verstärkte Sekretion bestimmter Cytokine, wie Interleukin-6, weist hingegen auf eine Aktivierung infizierter Makrophagen in Abwesenheit von p28 hin, wodurch die virale Replikation unterbunden sein könnte. In Anbetracht der Bedeutung der Replikationsfähigkeit in Makrophagen für die Ausbreitung einer OPV-Infektion im Wirtsorganismus, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass CPXV, im Fall einer weiteren Adaption an den Menschen, ein höheres Bedrohungspotential im Vergleich zu VACV aufweisen könnten.

## Summary

Today, following the eradication of human smallpox and its causative agent, variola virus, zoonotic infections caused by orthopoxviruses (OPV) are emerging as a potential human health threat. Especially cowpox viruses (CPXV), vaccinia viruses (VACV), and monkeypox viruses (MPXV) are gaining importance as a cause of infectious disease of man and livestock. These viruses differ considerably concerning their host range and their pathogenicity in human beings, which may be in part explained by their unique arsenals of immunomodulatory proteins. This study aimed to analyse and compare the gene expression profile of human (HeLa) cells following infection with CPXV, MPXV or VACV. Cellular genes were identified which were either commonly modulated by infection with any of the three viruses, or which were specifically modulated by one individual OPV. Particularly similar effects on cellular gene expression were observed in the case of CPXV and MPXV infection, which both induced the expression of several cytokine and chemokine genes. The biological consequences of this cytokine induction were further analysed using the example of CPXV infection. Especially interleukin-6, -8, and CXCL1 were strongly secreted by CPXV-infected cells but not by VACV-infected cells. Consequently, CPXV infection also induced a strong chemotactic recruitment of monocytes and macrophages *in vitro* in contrast to VACV infection. Especially macrophages are known to play a controversial role during OPV infection. On the one hand, macrophages are of importance for the control of the infection. On the other hand, infected macrophages also facilitate virus spread across the organism. Therefore, the capability of CPXV and VACV to replicate in macrophages was analysed. Thereby, the poxviral virulence factor p28, which is absent from most strains of VACV, was identified as an essential factor, allowing CPXV replication in macrophages. Characterisation of recombinant CPXV which either lacked p28 expression or encoded a mutated variant of p28 revealed reduced replication in a murine macrophage cell line, primary peritoneal rat macrophages and in human PBMC-derived macrophages. Absence of p28 expression resulted in a decreased expression of the cellular pro-survival factor Bcl-xL in infected macrophages. However, this did not result in apoptosis of the infected cells. Increased secretion of several cytokines like interleukin-6 rather suggests a potential activation of macrophages infected with CPXV lacking p28, which may subsequently inhibit virus replication. Concerning the importance of productively infected macrophages for OPV spread, these results suggest that CPXV, if further adapted to human beings as host species, may harbor a greater threat to human health when compared to VACV.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>II</b>
<b>Summary .....</b>	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Pockenviren .....	1
1.1.1 Taxonomie.....	2
1.1.2 Replikation von Orthopockenviren .....	3
1.2 Zoonotische Orthopockenviren.....	6
1.3 Modulation der Immunabwehr durch Orthopockenviren.....	9
1.4 Die Rolle infizierter Makrophagen in der Orthopockenvirus-Infektion .....	12
1.4.1 Das p28 Protein .....	12
1.5 Zielstellung .....	15
<b>2. Material &amp; Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	16
2.2 Bakterienstämme.....	17
2.3 Hefestämme .....	18
2.4 Humane und tierische Zellen .....	18
2.5 Viren .....	19
2.6 Nukleinsäuren .....	19
2.7 Antikörper, Enzyme & Liganden.....	21
2.8 Molekularbiologische Kits.....	22
2.9 TaqMan® Genexpressions-Tests .....	22
2.10 Puffer und Medien.....	23
2.10.1 Puffer .....	23
2.10.2 Medien für die Anzucht von <i>E. coli</i> .....	23
2.10.3 Medien für die Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> .....	23
2.10.4 Medien für die Zellkultur .....	24
2.11 Software.....	24
2.12 Mikrobiologische Methoden.....	25
2.12.1 Kultur und Anzucht von <i>E. coli</i> .....	25
2.12.2 Kultur und Anzucht von <i>S.cerevisiae</i> .....	25
2.13 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	25
2.13.1 Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	25
2.13.2 Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	25
2.13.3 Extraktion von Gesamt-DNA aus kultivierten Säugetierzellen .....	25
2.13.4 Extraktion von Gesamt-RNA aus kultivierten Säugetierzellen.....	26
2.13.5 cDNA-Synthese.....	26
2.13.6 Konzentrationsbestimmung gelöster Nukleinsäuren .....	26

2.13.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.13.8	Quantitative TaqMan® <i>real-time</i> PCR (qPCR)	27
2.13.9	Vergleich der Genexpression mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode	27
2.13.10	Sequenzierung von Nukleinsäuren nach Sanger	28
2.13.11	Genomsequenzierung mittels <i>Next-Generation Sequencing</i>	28
2.13.12	Restriktionsverdau von Nukleinsäuren	28
2.13.13	Restriktionsfragmentlängenanalyse	29
2.13.14	Klonierung von DNA-Fragmenten	29
2.13.15	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	29
2.13.16	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Plasmid-DNA	29
2.14	<i>Microarray</i> -basierte Genexpression-Analyse	30
2.14.1	Probenvorbereitung & Hybridisierung	30
2.14.2	Auslesung & Datenanalyse	30
2.14.3	Zuordnung identifizierter Gene zu biologischen Prozessen	31
2.15	BAC-Mutagenese über <i>en passant</i> Rekombination	31
2.15.1	Transformation von <i>E. coli</i> GS1783 zur Red-Rekombination	33
2.15.2	Identifizierung positiver Co-Integrate	33
2.15.3	Extraktion von BAC-DNA	34
2.15.4	Auflösen der Co-Integrate (2. Red Rekombination)	34
2.15.5	Identifizierung positiver Mutanten und Rekonstitution	35
2.16	Analyse von Protein-Protein Interaktionen	35
2.16.1	<i>Yeast-2-Hybrid Screening</i>	35
2.16.2	<i>Pull-down</i> Analyse	36
2.17	Zytologische Methoden	36
2.17.1	Zellpassagen	36
2.17.2	Zellen einfrieren und auftauen	37
2.17.3	Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA	37
2.17.4	Isolierung primärer peritonealer Makrophagen	37
2.17.5	Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)	37
2.17.6	Isolierung primärer CD14 <sup>+</sup> Monozyten aus PBMCs	38
2.17.7	Differenzierung von CD14 <sup>+</sup> Monozyten zu Makrophagen	38
2.17.8	Chemotaxis-Test	39
2.17.9	Zellanalyse durch Impedanzmessung im <i>xCELLigence</i> System	39
2.17.10	Analyse aktiver Caspasen in der Durchflusszytometrie	39
2.18	Virologische Methoden	40
2.18.1	Infektion	40
2.18.2	Virusanzucht	40
2.18.3	Virusaufreinigung	40
2.18.4	Plaque-Titrationstest	41
2.18.5	Detektion infizierter Zellen mittels Immunfluoreszenz-Test (IFT)	41

2.19 Proteinbiochemische Methoden.....	42
2.19.1 Proteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i> .....	42
2.19.2 Proteinextraktion aus Säugerzellen .....	42
2.19.3 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	42
2.19.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	42
2.19.5 Proteinfärbung im SDS-Polyacrylamid-Gel .....	43
2.19.6 Western-Blot und Immundetektion .....	43
2.19.7 Identifizierung von Proteinen in der Massenspektrometrie .....	44
2.20 Analyse der Cytokin-Sekretion <i>in vitro</i> .....	44
2.20.1 <i>Proteome Profiler</i> <sup>TM</sup> Antikörper-Array .....	45
2.20.2 ELISA .....	45
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
3.1 Vergleichende Analyse des Genexpressionprofils OPV-infizierter Zellen.....	46
3.1.1 Etablierung der Infektionsbedingungen.....	46
3.1.2 Die Mehrheit der zellulären Gene bleibt von der Infektion unbeeinflusst.....	48
3.1.3 Der Einfluss auf die zelluläre Genexpression ist Virus-spezifisch .....	49
3.1.4 CPXV und MPXV beeinflussen die Expression Immun-assoziiierter Gene .....	50
3.1.5 CPXV und MPXV induzieren Cytokin-Gene stärker als VACV.....	51
3.2 Verifizierung der <i>Microarray</i> -Ergebnisse mittels TaqMan® qPCR.....	52
3.3 Detektion sekretierter Cytokine nach CPXV- und VACV-Infektion .....	54
3.4 Kinetik der Sekretion von IL-6, IL-8 und CXCL1 .....	55
3.5 CPXV induziert die Rekrutierung von Makrophagen und Monozyten <i>in vitro</i> .....	56
3.6 Analyse der Replikationsfähigkeit von OPV in Makrophagen .....	58
3.6.1 Vergleich des CPEs verschiedener VACV Stämme in Makrophagen .....	58
3.6.2 Konstruktion von CPXV mit mutiertem p28 Gen.....	59
3.6.3 <i>In vitro</i> Charakterisierung der Replikationseffizienz der Δp28-CPXV.....	61
3.6.4 Kinetik der Genomreplikation p28-mutierter CPXV in J774A.1 Zellen.....	62
3.6.5 Die Produktion neuer Viruspartikel in J774A.1 Zellen ist p28-abhängig .....	64
3.6.6 Die Replikation von CPXV in primären Makrophagen ist p28-abhängig .....	64
3.7 Die Bedeutung der Apoptose bei der Δp28-CPXV-Infektion .....	66
3.7.1 Reduktion von Bcl-xL in CPXV-Δp28-Bln-infizierten J774A.1 Zellen .....	67
3.7.2 Replikation von CPXV-Δp28-Bln in Gegenwart von Z-LEHD-fmk .....	68
3.7.3 Quantifizierung Virus-induzierter Apoptose in J774A.1 Zellen .....	69
3.8 Analyse der Expression früher und später Virus-Proteine in J774A.1 Zellen.....	70
3.9 Analyse der Interferon-Genexpression infizierter J774A.1 Zellen.....	71
3.10 Analyse der Cytokin-Sekretion infizierter J774A.1 Zellen .....	72
3.11 Identifizierung zellulärer und viraler Interaktionspartner des p28 Proteins .....	73
3.11.1 Suche nach zellulären Interaktionspartnern im <i>Yeast-2-Hybrid Screening</i> .....	73
3.11.2 Suche nach zellulären oder viralen Interaktionspartnern im <i>Pull-down</i> Test ...	74

<b>4. Diskussion .....</b>	<b>78</b>
4.1 Das Genexpressionsprofil VACV-, CPXV- und MPXV-infizierter Zellen .....	79
4.2 Gemeinsamkeiten bei der Regulation zellulärer Gene .....	80
4.3 Unterschiedliche Regulation immunbiologisch-relevanter Gene .....	81
4.4 Regulation von Cytokinen und Chemokinen.....	84
4.5 Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen .....	87
4.6 Makrophagen in der OPV-Infektion .....	88
4.7 Die Bedeutung des p28 Proteins für CPXV .....	90
4.8 Die molekulare Funktion des p28 Proteins.....	92
4.9 Die anti-apoptotische Aktivität des p28 Proteins.....	93
4.10 Ursachen der frühen Hemmung der Infektion mit $\Delta$ p28-CPXV .....	95
4.11 Interaktionspartner des p28 Proteins .....	99
4.12 Schlussfolgerung & Ausblick .....	101
<b>5. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>118</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Pockenviren

Die Familie der Pockenviren (*Poxviridae*) umfasst eine große Anzahl verschiedener Virusspezies, die Säugetiere, Vögel und Insekten infizieren. Pockenviren sind durch komplex aufgebaute Virionen mit einer Größe von ca.  $360 \times 270 \times 250$  nm charakterisiert (49, 50, 143). Das Genom liegt als Doppelstrang-(ds)DNA vor, mit einer je nach Genus und Stamm variierenden Länge von ca. 130-375 kbp, und codiert für ca. 130-260 offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) (181). Die ORFs im zentralen Teil des Genoms (ca. 100 kbp) sind zumeist hochgradig konserviert, während die ORFs der terminalen Regionen variabel sind (65, 211).

Als Pathogen des Menschen war insbesondere das Variola Virus (VARV) von großer Bedeutung. Die vom VARV verursachte Pockenerkrankung (*smallpox*) ist eine der ältesten bekannten Infektionskrankheiten des Menschen und war einst weltweit verbreitet (72, 143, 170). Zur Prävention einer VARV-Infektion führte Edward Jenner 1796 erfolgreich Versuche zur Impfung mit einem verwandten, von der Kuh stammenden Pockenvirus durch. Nach dem lateinischen Wort für Kuh “*Vacca*” erhielt dieses “Kuhpockenvirus” den Namen *Vaccinia* Virus (VACV) und der Vorgang wurde als Vakzinierung bekannt. Die von Jenner untersuchte und geförderte Praktik der Vakzinierung verdrängte in den folgenden Jahren die zuvor vorherrschende, aber weitaus gefährlichere Variolisierung, die auf einer subkutanen Einbringung von VARV in nicht-immune Individuen basierte. Er schaffte damit die Grundlage für alle heute verwendeten Impfungen gegen Erreger von Infektionskrankheiten (170). Die Weiterentwicklung der Pockenimpfung gipfelte 1958 in einem weltweiten, von der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) initiierten Impfprogramm, mit dem Ziel der vollständigen Ausrottung des VARV. Im Jahr 1977 trat in Somalia die letzte natürliche humane Pockenerkrankung weltweit auf (220). 1980 wurden die humanen Pocken von der WHO für ausgerottet erklärt und die Einstellung der Impfungen auf Grund der vorhandenen Nebenwirkungen empfohlen (71, 142). Da für das VARV neben dem Menschen kein natürlicher Wirt existiert, kommt dieses Virus in der Natur nicht mehr vor. Lediglich in zwei Regierungslaboratorien, den *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, USA) und dem *State Research Centre for Virology and Biotechnology* (VECTOR, Koltsovo, Russische Föderation) werden noch Stammsammlungen des VARV aufbewahrt und

zu Forschungszwecken verwendet. Die vollständige Vernichtung aller verbliebenen Viren wird diskutiert (6, 115, 219).

Neben dem VARV sind mehrere weitere Pockenviren verschiedener Genera in der Lage, Erkrankungen des Menschen hervorzurufen. Am weitesten verbreitet sind Infektionen mit dem Molluscum contagiosum Virus, welches wie das VARV humanspezifisch ist und in der Regel eine lokal begrenzte Erkrankung der Haut auslöst (19, 64). Seit dem Ende der Impfkampagne gegen die Pocken treten zudem vermehrt zoonotische Infektionen des Menschen mit ursprünglich tierpathogenen Pockenviren auf (66).

Eine Bedrohung der öffentlichen Gesundheit durch Pockenviren könnte somit im unwahrscheinlichen Fall einer erneuten Freisetzung des VARV entstehen. Zudem besteht die Gefahr, dass verwandte Pockenviren durch gezielte genetische Modifikation ein dem VARV vergleichbares pathogenes Potential erlangen. Dass sich die Virulenz eines Pockenvirus durch heterologe Einbringung fremder Gene steigern lässt, wurde bereits am Beispiel des Mauspockenvirus gezeigt (199). Auch kann die komplett synthetische Herstellung eines Virus mit den Fortschritten der Molekularbiologie nicht mehr ausgeschlossen werden (132). Die wahrscheinlichste Bedrohung für die öffentliche Gesundheit stellt jedoch die Übertragung tierpathogener Pockenviren auf den Menschen dar (66). Zur präzisen Beurteilung dieser Bedrohung ist eine weitere Erforschung der Faktoren, welche die Pathogenität und den Wirtsbereich von Pockenviren determinieren, dringend erforderlich.

### 1.1.1 Taxonomie

Die *Poxviridae* werden in zwei Unterfamilien unterteilt: Die *Chordopoxvirinae* umfassen die Pockenviren der Wirbeltiere, die *Entomopoxvirinae* diejenigen der Insekten. Die *Chordopoxvirinae* verteilen sich auf zehn Genera (98). Vertreter eines Genus ähneln sich genetisch und serologisch, sowie bezüglich Morphologie und Wirtstropismus (143). Humanpathogene Pockenviren finden sich in den Genera Orthopoxvirus, Molluscipoxvirus, Parapoxvirus und Yatapoxvirus (36, 66, 91, 120). In dieser Arbeit werden ausschließlich Orthopockenviren (OPV) behandelt, zu denen neben dem VARV auch bedeutende Zoonose-Erreger wie das Vaccinia Virus, das Affenpockenvirus (*monkeypox virus*, MPXV) und das Kuhpockenvirus (*cowpox virus*, CPXV) zählen. In Tabelle 1 ist die Aufteilung der Familie der *Poxviridae* in Unterfamilien und Genera mit jeweils charakteristischen Vertretern aufgeführt. Humanpathogene Pockenviren sind rot hervorgehoben.

**Tabelle 1: Bedeutende Vertreter der *Poxviridae*** (modifiziert nach (98, 140)).

Unterfamilie	Genus	Spezies (Auswahl)
Pockenviren der Wirbeltiere ( <i>Chordopoxvirinae</i> )	Orthopoxvirus	<b>Variola Virus</b> <b>Vaccinia Virus</b> <b>Kuhpockenvirus</b> <b>Affenpockenvirus</b> Ectromelievirus etc.
	Parapoxvirus	<b>Pseudokuhpockenvirus</b> <b>Orfvirus</b> etc.
	Avipoxvirus	Geflügelpockenvirus etc.
	Capripoxvirus	<i>Lumpy skin disease virus</i> Schafpockenvirus Ziegenpockenvirus
	Leporipoxvirus	Myxomatosevirus etc.
	Suipoxvirus	Schweinepockenvirus
	Molluscipoxvirus	<b>Molluscum contagiosum Virus</b>
	Yatapoxvirus	<b>Tanapockenvirus</b> <b>Yabapockenvirus</b>
	Cervidpoxvirus	<i>Mule deerpox virus</i>
	Crocodylidpoxvirus	<i>Nile crocodilepox virus</i>
	ohne Zuordnung	<i>Squirrelpox virus</i>
Pockenviren der Insekten ( <i>Entomopoxvirinae</i> )	$\alpha$ - / $\beta$ - / $\gamma$ - Entomopoxvirus	Pockenviren der Käfer, Schmetterlinge, Dipteren und ihrer Larven

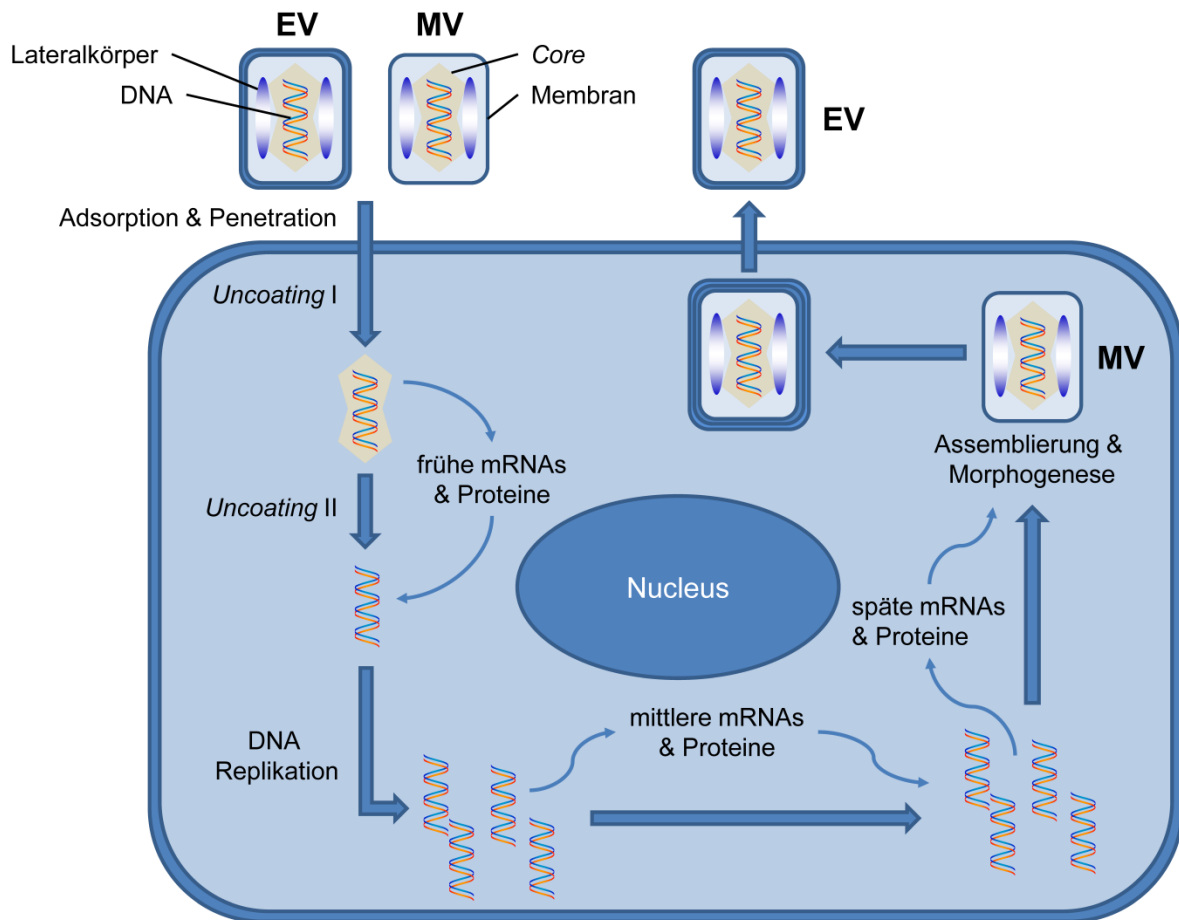
rot = potentiell humanpathogene Pockenviren, **fett** = humanspezifische Pockenviren

### 1.1.2 Replikation von Orthopockenviren

Die erfolgreiche Virusvermehrung im infizierten Wirt lässt sich auf verschiedenen Ebenen betrachten, welche unterschiedliche Aspekte der Virus-Wirt Interaktion wiedergeben. Auf der zellulären Ebene kann die Virusreplikation permissiv, semi-permissiv oder abortiv verlaufen. Dies ist oft abhängig vom Zelltyp oder dem Spezies-Ursprung der Wirtszelle. Auf der Ebene ganzer Organe und Gewebe werden die Virus-Replikation und Verbreitung sowohl durch den zellulären Tropismus, als auch durch Gewebe-spezifische antivirale Mechanismen definiert. Die dritte Ebene, welche die systemische Pathogenese und die klinische Manifestation im infizierten Wirt wiedergibt, wird durch die ersten zwei Ebenen, sowie durch die systemische Immunantwort des Wirts bestimmt. Alle drei Ebenen beeinflussen, ob ein Virus eine bestimmte Wirtsspezies erfolgreich infizieren kann (133). Im Folgenden ist der intrazelluläre Replikationszyklus der OPV wiedergegeben, der vor allem am Beispiel des VACV erforscht wurde.

Pockenviren weisen einen komplexen Replikationszyklus auf in dessen Verlauf zwei verschiedene infektiöse Partikelformen entstehen, die *mature virions* (MVs) und die *extracellular virions* (EVs) (143). Die MVs setzen sich aus dem viralen Kapsid (*Core*), welches das dsDNA Genom enthält, zwei Lateralkörpern und einer umhüllenden Lipidmembran zusammen. Die EVs bestehen aus einem MV-artigen Partikel, das zusätzlich mit einer zweiten Lipidmembran umgeben ist. Im intakten Zustand teilen beide Partikelformen keine gemeinsamen Oberflächenepitope. Die in größerer Zahl gebildeten MVs sind vermutlich für die Wirt-zu-Wirt Transmission verantwortlich, während EVs die Verbreitung im infizierten Wirtsorganismus vermitteln (194). Die EVs bleiben überwiegend Zell-assoziiert und induzieren die Bildung von Aktin-Ausläufern, welche die Viruspartikel zu Nachbarzellen transportieren. Hingegen vermitteln EVs, welche in Körperflüssigkeiten abgegeben werden, vermutlich die Verbreitung zwischen verschiedenen Geweben (179).

Die Infektion beginnt mit der Adsorption der Viruspartikel an die Oberfläche der Wirtszelle, wobei EVs und MVs unterschiedliche Rezeptoren nutzen (212). MVs binden Glykosaminoglykane oder andere universell exprimierte Oberflächenkomponenten (179). EVs nutzen andere, noch unbekannte Rezeptoren. Die Nutzung ubiquitärer Adhäsionsfaktoren und verschiedener, teilweise redundanter Bindemechanismen erlaubt es den OPV in ein breites Spektrum verschiedener Zelltypen einzudringen. Im Gegensatz zu vielen anderen Viren wird daher der Wirtsbereich kaum durch das Vorhandensein spezifischer Rezeptoren und die erfolgreiche Adsorption und Penetration bestimmt, sondern überwiegend durch intrazelluläre Ereignisse, welche auf den *Entry* Vorgang folgen (133). Die adhärennten Viruspartikel gelangen über direkte Fusion der Virusmembran mit der Zytoplasmamembran oder über Endozytose bzw. Makropinozytose (136) und anschließende Fusion mit der Endosomenmembran in das Zytoplasma der Zelle (8, 40, 49, 179). Eine Besonderheit innerhalb der DNA-Viren ist, dass die Replikation ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszelle stattfindet (224). Der Replikationszyklus läuft dabei in definierten, morphologisch abgrenzbaren Bereichen ab, den sogenannten Virusfabriken. Diese bilden sich zu Beginn der DNA-Replikation und werden erst mit Beginn der Virusmorphogenese wieder aufgelöst (205). Eine permissive virale Replikation ist durch drei Wellen viraler mRNA und Proteinsynthese charakterisiert (*early*, *intermediate*, *late*), gefolgt von der Morphogenese und Freisetzung infektiöser Partikel. Der Replikationszyklus ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Replikationszyklus der OPV** (nach (133)). Dargestellt sind die Phasen der Replikation im Zytoplasma der Wirtszelle. Frühe, mittlere und späte Transkription und Proteinsynthese folgen aufeinander. Am Ende folgen die Morphogenese der Nachkommenviren und die teilweise Freisetzung als EVs. Weitere Erläuterungen im Text. MV = *mature virion*; EV = *extracellular virion*.

Die Transkription der frühen (*early*) viralen Gene beginnt noch im intakten Virus-Core durch Proteine, welche als Bestandteile des Core in die Zelle eingebracht werden (30, 31, 75, 154). Etwas mehr als die Hälfte der viralen Gene wird in dieser Phase der Infektion transkribiert (223). Erst im Anschluss an die frühe Transkription erfolgt die Freisetzung des Virus-Genoms in das Zytoplasma der Wirtszelle (143). Die Transkription der mittleren (*intermediate*) Gene wird durch frühe virale Proteine induziert, und setzt die erfolgte Replikation der viralen DNA voraus. Die mittleren Transkripte kodieren unter anderem für regulatorische Proteine, welche die Transkription der späten (*late*) Gene einleiten. Die späten mRNAs kodieren überwiegend virale Strukturproteine und Enzyme die Bestandteile der infektiösen Partikel sind. Im Gegensatz zur frühen Transkription werden bei der mittleren und der späten Transkription zudem Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle benötigt (29, 143). Die frühe virale Transkription ist bereits ca. 20 min nach Infektion (*post infectionem*, p.i.) nachweisbar und erreicht ca. 1-2 h p.i. ihren Höhepunkt (13, 143). Die mittlere Phase verläuft ca. zwischen 100 min und 2 h p.i.

(13, 143), gefolgt von der späten Phase, welche ca. von 140 min bis 24 h p.i. stattfindet (143, 154). Im Verlauf der DNA-Replikation werden pro Zelle bis zu 10.000 neue Genomkopien gebildet, von denen schließlich ca. 50 % in neue Viruspartikel verpackt werden (143).

Die Assemblierung der Viruspartikel erfolgt noch in den Virusfabriken. Der Nukleoproteinkomplex wird in kuppelförmige Membranfragmente eingelagert, welche sich vom glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) ableiten. Diese schließen sich zu einem sphärischen Vesikel, dem MV. Die MV-Partikel werden über Mikrotubuli von den Virusfabriken in die Peripherie der Zelle transportiert, wo ein Teil der Viren mit zwei weiteren Membranen umgeben wird, welche sich vom trans-Golgi-Netzwerk ableiten. Die so entstandenen, dreifach membranumhüllten Virionen werden über Mikrotubuli und Aktin-Filamente zur Zytoplasmamembran transportiert. Eine der äußeren Membranhüllen verschmilzt mit der Zellmembran, wodurch die Viruspartikel als EVs an die Außenseite gelangen. Eine Fraktion der EVs bleibt mit der Zelloberfläche assoziiert, während andere in das extrazelluläre Medium freigesetzt werden (143, 193, 194).

## 1.2 Zoonotische Orthopockenviren

Pockenviren, die als Erreger von Zoonosen medizinisch oder veterinärmedizinisch relevant sind, finden sich überwiegend im Genus OPV. Die OPV weisen untereinander immunologische Kreuzreaktivität und Kreuzprotektion auf, so dass die Infektion mit einem beliebigen OPV - zumindest zeitweilig - immunologischen Schutz gegenüber der Infektion mit jedem anderen verleiht. Diese Eigenart machte sich bereits Edward Jenner bei seinen Versuchen zur Vakzinierung mit CPXV gegen VARV-Infektionen zu Nutze. Aufgrund der Kreuzimmunität fällt das zunehmende Auftreten zoonotischer OPV Erkrankungen vermutlich erst mit der Ausrottung des VARV und dem Ende der Impfkampagnen zusammen (58, 171).

Als OPV, die zoonotische Erkrankungen des Menschen auslösen können, gelten VACV, CPXV und MPXV (66, 145). Das VACV, welches auch als Lebendimpfstoff eingesetzt wurde, zeigt im Allgemeinen nur eine geringe Virulenz im Menschen. Es wurden jedoch auch schwere Infektionsverläufe nach Verimpfung oder als Folge von Laborunfällen beschrieben (41, 135). Seit 1999 wurden mehrere Ausbrüche natürlich auftretender VACV-Infektionen in Brasilien beschrieben (58, 207-209). Die Infektionen treten überwiegend bei Milchvieh auf, sowie bei Menschen, welche direkten Kontakt zu infizierten Tieren hatten. Symptomatische oder asymptomatische Infektionen mit VACV wurden zudem bei einer Vielzahl weiterer Tierarten nachgewiesen, unter anderem bei Nagetieren. Humane VACV-Infektionen sind

durch Hautläsionen, insbesondere im Bereich der Hände, und allgemeine Symptome, wie Fieber, Myalgie, Kopfschmerzen und Lymphadenopathie charakterisiert (112). Insgesamt ist aufgrund der zunehmenden genetischen Diversität und der andauernden Zirkulation in Wildtieren und domestizierten Tieren von einer beständigen Bedrohung von Mensch und Tier durch VACV auszugehen (112). Von ähnlicher klinischer und ökonomischer Bedeutung als Zoonoseerreger ist das sehr eng mit VACV verwandte Büffelpockenvirus (BPXV), welches vor allem in Südasien auftritt (17, 82, 188). BPXV wird aufgrund der phylogenetischen Ähnlichkeit zumeist nicht als eigene Spezies, sondern als VACV Stamm bewertet (17, 187, 189, 222). Neben dem Büffel als natürlichem Wirt wurden Infektionen von Kühen und Menschen beschrieben (188). Seit 2006 kam es zudem zu mehreren BPXV Ausbrüche in Indien (17, 54, 82, 213).

Während VACV und CPXV bereits zu Zeiten von Edward Jenner bekannt waren, wurde **MPXV** erst 1957 als Krankheitserreger bei Zoo-Affen beschrieben. In den folgenden Jahren kam es immer wieder zu Ausbrüchen in europäischen und amerikanischen Zoos (7). MPXV tritt endemisch in den tropischen Regenwäldern Afrikas auf, wobei einheimische Hörnchen-Arten das natürliche Reservoir darstellen. Humane MPXV-Infektionen wurden erstmals in den 1970er Jahren in Zentral- und Westafrika beschrieben (101). Die Symptome einer humanen MPXV-Infektion ähneln stark der einer VARV-Infektion, jedoch mit geringerer Morbidität und Mortalität (25, 55). Zudem ist die Mensch-zu-Mensch Übertragung bei MPXV sehr ineffizient, mit Übertragungsraten von ca. 3 % im Vergleich zu ca. 80 % bei VARV (55, 66). Die Schwere der Erkrankung hängt dabei stark vom jeweiligen MPXV Stamm und seinem geographischen Ursprung ab. Zentralafrikanische Isolate weisen gegenüber westafrikanischen Isolaten eine höhere Virulenz im Menschen auf (44, 122). Die ineffiziente Mensch-zu-Mensch Übertragung lässt vermuten, dass das MPXV zurzeit nicht in der Lage ist, sich als Humanpathogen zu etablieren. Die zoonotische Übertragung auf den Menschen stellt aber in Gebieten, in denen MPXV endemisch in Nagetierpopulationen auftritt, ein konstantes Risiko dar. Zudem hat der MPXV Ausbruch in den USA im Jahr 2003 deutlich gemacht, dass MPXV über das Potential verfügen, sich außerhalb Afrikas in neuen tierischen Reservoiren zu etablieren (55, 60).

In Europa sind vor allem **CPXV** als Zoonoseerreger von Bedeutung. Die CPXV zeichnen sich durch den vermutlich breitesten Wirtsbereich aller OPV aus (4, 66). Bereits zu Zeiten Edward Jenners wurden CPXV-Infektionen von Milchkühen und gelegentlich auftretende zoonotische Infektionen an den Händen von Melkern beschrieben (14). Während wildlebende Nagetiere

vermutlich die Reservoir-Wirte darstellen (43), konnten CPXV-Infektionen inzwischen auch bei verschiedensten domestizierten Tieren, insbesondere bei Katzen, aber auch bei exotischen Zootieren nachgewiesen werden (14, 16, 66). Die Schwere der resultierenden Erkrankung ist dabei, zumindest im Tiermodell, stark abhängig vom Infektionsweg und der Infektionsdosis und insbesondere vom jeweiligen CPXV Stamm. Die Charakterisierung von CPXV Isolaten hat dabei eine ungewöhnlich große Heterogenität der CPXV Stämme im Vergleich zu anderen OPV Spezies aufgezeigt. Auch konnte eine regionale und zeitliche Kozirkulation verschiedener CPXV Stämme in Deutschland gezeigt werden, während in England ein dominierender Stamm vorzuliegen scheint (66, 138). Die fortschreitende Sequenzierung und Analyse von CPXV Genomen hat zudem in den letzten Jahren immer deutlicher aufgezeigt, dass CPXV keine phylogenetische Einheit, sondern vielmehr eine Gruppierung unterschiedlicher OPV Spezies darstellen (39).

CPXV-Infektionen des Menschen kommen überwiegend durch direkten Kontakt zu infizierten Haustieren, oder seltener, Zootieren zu Stande. Die Übertragung über infizierte Hauskatzen und zunehmend auch Ratten („Schmuseratten“) hat dabei die, heutzutage nicht mehr auftretende, Übertragung über infizierte Milchkühe verdrängt (38, 66, 113, 151). Infektionen mit CPXV stellen aber vermutlich keine enzootische Erkrankung in Ratten dar, da ansonsten eine weltweite Verbreitung der Viren zu erwarten wäre (43). Bisher wurde keine Mensch-zu-Mensch Übertragung beschrieben. In der Regel löst eine CPXV-Infektion lokal beschränkt Hautläsionen aus. Bei Menschen mit eingeschränktem Immunsystem wurden jedoch auch systemische Erkrankungen mit teilweise fatalen Verläufen beschrieben (51, 159).

Keines der beschriebenen zoonotischen OPV hat bereits das Potential, die Nische zu besetzen, welche durch die Ausrottung des VARV entstanden ist. Allerdings wird angenommen, dass auch das VARV ursprünglich aus einer zoonotischen Viruserkrankung hervorgegangen ist und sich im Folgenden durch wenige Mutationen an den Menschen adaptiert hat (121). Eine Überwachung zukünftiger evolutionärer Veränderungen dieser Viren und eine bessere Erforschung der Faktoren, welche die Transmission und Virulenz von OPV beeinflussen, sind daher notwendig. Hierbei spielen vermutlich insbesondere die zahlreichen unterschiedlichen immunmodulatorischen Faktoren der OPV eine wichtige Rolle. Tabelle 2 zeigt die beschriebenen OPV im Überblick.



**Tabelle 2: Humanpathogene Orthopockenviren** (modifiziert nach (133)).

Virus	Wirtsbereich <i>in vivo</i>	
	Reservoir	Zoonosen
VARV	Mensch	keine
MPXV	Nager, Hörnchen	Affe, Präriehund, Mensch
CPXV	Nager (Wühlmaus, Waldmaus, Ziesel, Rennmaus, Lemming)	Mensch, Kuh, Katze, Fuchs, diverse Zootiere
VACV*	unbekannt	Breiter Wirtsbereich, inkl. Mensch

\*Weitere humanpathogene OPV stammen vermutlich von VACV ab, z.B. Kaninchenpockenviren, Büffelpockenviren, sowie Cantagalo und Araçatuba Viren.

### 1.3 Modulation der Immunabwehr durch Orthopockenviren

Viren sind darauf angewiesen, ihre Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem des Wirts zu begrenzen. Hierzu nutzen OPV verschiedenste Strategien und eine Vielzahl von Proteinen zur Manipulation von Schlüsselkomponenten der Immunantwort. Viele der heute bekannten virale Immunmodulatoren wurden dabei auf Basis von Sequenz-Homologien zu zellulären Proteinen identifiziert (181). Im Genom der OPV sind immunmodulatorische Gene überwiegend in den Termini angeordnet. Sie variieren teilweise stark bezüglich Sequenz, Struktur und Funktion zwischen verschiedenen OPV. In zentralen Genombereichen finden sich hingegen vorwiegend hoch-konservierte Gene (~ 90), welche essentielle Funktionen bei der Virusreplikation innehaben (79). Diese Gruppierung nicht-essentieller Gene begünstigt möglicherweise die Umgestaltung im Rahmen der Adaption an einen neuen Wirt (4).

Die Vielzahl verschiedener Immunmodulatoren spiegelt sich in der Tatsache wider, dass kein einzelnes Virus alle bekannten ORFs in sich vereint. Allerdings können alle bekannten ORFs der OPV auch bei verschiedenen CPXV gefunden werden (83), welche vermutlich die ursprünglichsten noch-existierenden OPV darstellen (184). Die Reduktion dieses ursprünglichen Gen-Repertoires geht vermutlich einher mit der Spezialisierung der Viren und der Anpassung an einen Wirt (83). So fehlen dem VARV viele dieser vermutlich ursprünglichen Gene, was wahrscheinlich zur Einengung des Wirtsbereichs auf den Menschen als einzigen Wirt beitrug (76, 124). Insbesondere OPV mit breitem Wirtsbereich kodieren hingegen eine Vielzahl verschiedener immunmodulatorischer Proteine (4, 181, 184). Die verschiedenen Immunmodulatoren der OPV sind in Abbildung 2 zusammengefasst. Die hierbei eingesetzten Strategien zur Immunmodulation lassen sich drei unterschiedlichen funktionalen Kategorien zuordnen (105):

- 1) Maskierung von Signalen, welche die Virusinfektion anzeigen (*virostealth*)
- 2) Manipulation extrazellulärer Signalwege und Cytokin-Netzwerke (*viromimicry*)
- 3) Inhibierung intrazellulärer antiviraler Mechanismen und Signalwege (*virotransduction*)

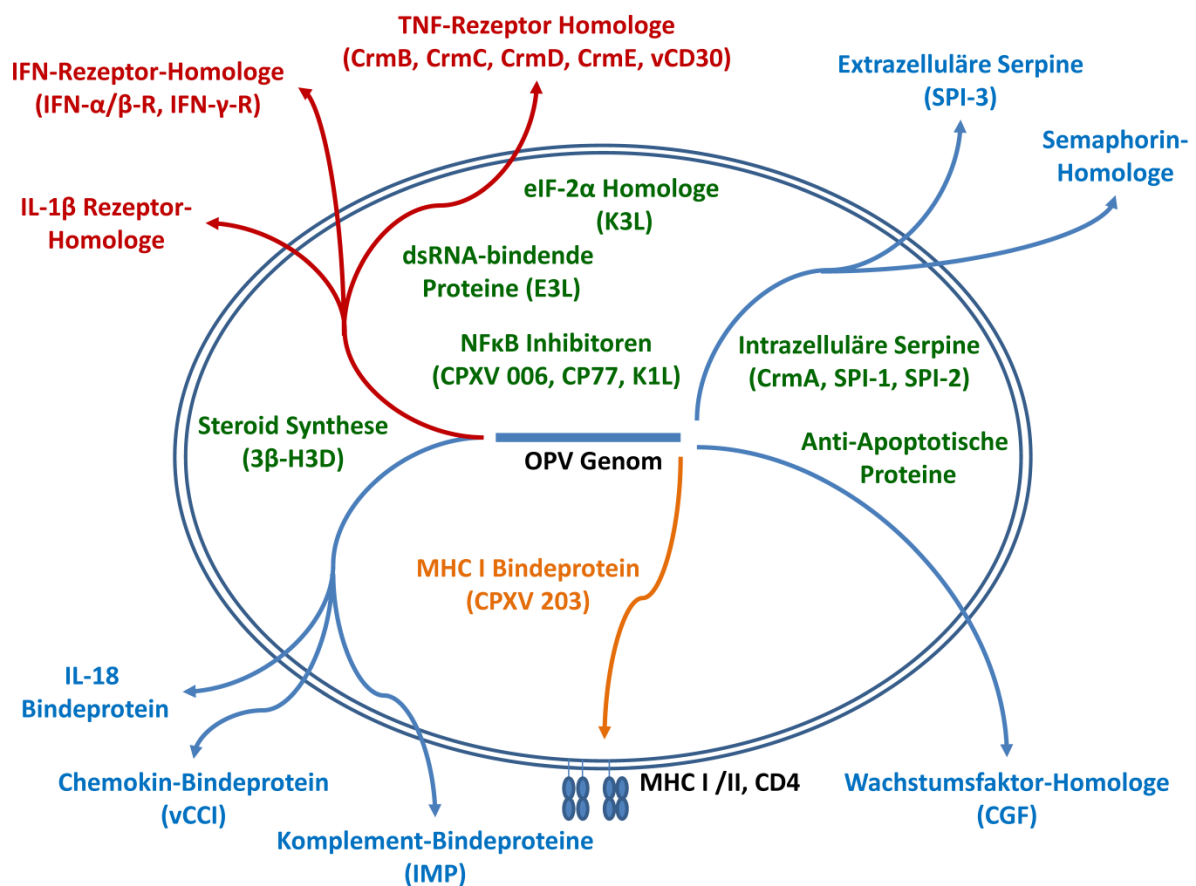
Die **Maskierung von Signalen** erfolgt z.B. durch die Manipulation der Antigenpräsentation und der Kapazität von Leukozyten zur Erkennung und Eliminierung infizierter Zellen. Um einer Erkennung durch Immunzellen zu entgehen, interferieren OPV mit der Antigenpräsentation über MHC (*major histocompatibility complex*) Moleküle der Klassen MHC I (56, 134, 206) und MHC II (166, 167).

Die **Manipulation extrazellulärer Signalwege und Cytokin-Netzwerke** durch virale Proteine wirkt zudem der inflammatorischen Reaktion des Wirts entgegen und schafft eine geeignete Mikroumwelt für die Virusreplikation in infizierten Geweben. Dies erfolgt durch virale Homologe von Cytokinen (*virokines*) oder Cytokin-Rezeptoren (*viroceptors*) (4, 105, 181). **Virale Cytokin-Homologe** ahmen in der Regel zelluläre Wachstumsfaktoren und anti-inflammatorische zelluläre Cytokine, sowie Komplement-Regulatoren nach (105). Hierzu zählen aber auch Cytokin-bindende Proteine wie der Pan-Chemokin-Inhibitor vCCI, welcher der Funktion von Chemokinen entgegen wirkt (3, 35, 191). Chemokine werden als Antwort auf eine virale Infektion gebildet und koordinieren die Aktivierung und Migration von Leukozyten zum Ort der Infektion. **Virale Cytokin-Rezeptor-Homologe** sequestrieren Cytokine, welche ansonsten antivirale oder inflammatorische Prozesse fördern würden. Alle OPV kodieren Homologe zellulärer Interferon-(IFN-)Rezeptoren, sowie Rezeptoren für IFN induzierte Cytokine wie die Interleukine (ILs) IL-18 und IL-1 $\beta$  (4, 160, 181). Weiterhin kodieren OPV verschiedene virale Tumornekrosefaktor-(TNF-)Rezeptoren (vTNFRs), welche extrazelluläres TNF binden und den zellulären Rezeptoren vorenthalten (181, 201). Fünf verschiedene vTNFRs sind bei den OPV bekannt, aber nur CPXV kodieren alle vier sogenannten *Cytokine response modifier* (Crm) Proteine (CrmB, CrmC, CrmD, CrmE), sowie das virale CD30 Rezeptor-Homolog vCD30. CPXV-kodierte Crm-Proteine weisen unterschiedliche zeitliche Expressionsmuster und unterschiedliche Spezies-Spezifitäten auf und tragen vermutlich zu dem breiten Wirtsbereich der CPXV bei (4, 76, 181).

Die Wirkung extrazellulärer Modulatoren überschneidet sich mit der **Modulation intrazellulärer Signalwege und antiviraler Mechanismen** durch OPV. So werden neben der Sequestrierung pro-inflammatorischer Cytokine durch virale Rezeptor-Homologe und Bindeproteine auch intrazelluläre Signalwege manipuliert, welche die Expression dieser

Cytokine regulieren (141). Weiterhin inhibieren OPV die Aktivierung pro-inflammatorischer Cytokine wie IL-1 $\beta$  und IL-18 durch die zelluläre Caspase-1 (*Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme*, ICE) über den viralen Caspase-Inhibitor CrmA/SPI-2 (162, 181). Die Wirkung von Cytokinen wird zudem durch die Manipulation Cytokin-aktivierter zellulärer Signalwege inhibiert. Hierzu zählen pro-inflammatorische und pro-apoptotische Prozesse. Ein Beispiel stellt die Inhibierung TNF-induzierter Apoptose durch CrmA/SPI-2 dar, welches die TNF-induzierte Funktion der pro-apoptotischen Initiatorcaspase-8 inhibiert (181, 201).

Weitere bekannte Immunmodulatoren der OPV umfassen u.a. virale Komplement-Bindeproteine, anti-inflammatorische Serpine, Wachstumsfaktor-Homologe und Apoptoseregulatoren (4, 105, 181, 201).



**Abbildung 2: Immunmodulation durch OPV am Beispiel von CPXV** (modifiziert nach (105)). Schematische Darstellung ausgewählter immunmodulatorischer Proteine der OPV. Abgebildet sind Proteine, welche an der Maskierung von Signalen (Orange) beteiligt sind, welche eine Virusinfektion anzeigen, sowie virale Proteine, die Cytokin-Rezeptor-Homologe (rot) oder Cytokin-Homologe (blau) darstellen oder an der Manipulation intrazellulärer Signalwege (grün) mitwirken. Weitere Erläuterungen im Text.

## 1.4 Die Rolle infizierter Makrophagen in der Orthopockenvirus-Infektion

Makrophagen können im Rahmen einer OPV-Infektion sowohl für die Ausbreitung, als auch für die Eindämmung der Infektion von großer Bedeutung sein. Eine VARV-Infektion erfolgte überwiegend über die Atemwege nach Aerosol-Übertragung. Die weitere Ausbreitung fand über infizierte Makrophagen statt, welche die Viren zu den regionalen Lymphknoten und zu weiteren lymphatischen Organen, wie Milz und Knochenmark, transportierten (143). Auch bei der Ausbreitung der Infektion auf die Epidermis, welche die charakteristischen Hautläsionen zur Folge hatte, spielten infizierte Makrophagen vermutlich eine primäre Rolle. Andererseits zeigten Versuche mit Mauspockenviren (Ectromelievirus, ECTV) auch eine essentielle Funktion von Makrophagen bei der Bekämpfung der Infektion (108). Auch bei der Kontrolle lokal begrenzter VACV-Infektionen spielen Makrophagen und insbesondere Langerhans-Zellen der Haut vermutlich eine wichtige Rolle (15, 86, 143, 148). Makrophagen transportieren die Viren zu den Lymphknoten, präsentieren virale Antigene gegenüber Lymphozyten und tragen somit zur Initiation der adaptiven Immunantwort bei, welche die Infektion letztendlich beseitigt (143). Im Gegensatz zu VARV sind VACV jedoch scheinbar nicht zur Replikation in Makrophagen befähigt (34, 95) und können diese daher vermutlich nicht für ihre Verbreitung nutzen. Die Bedeutung von Makrophagen bei der CPXV-Infektion ist bisher weniger gut untersucht. Im Gegensatz zu VACV wurde die Fähigkeit zur Replikation in Makrophagen für CPXV jedoch beschrieben (172). Eine mögliche Ursache der abortiven VACV-Infektion von Makrophagen könnte das Fehlen des viralen p28 Proteins bei den meisten VACV Stämmen sein.

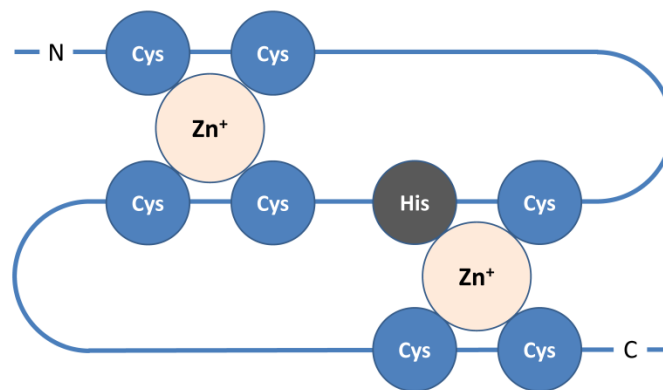
### 1.4.1 Das p28 Protein

Das p28/N1R Protein wurde erstmalig als bedeutender Virulenzfaktor von ECTV beschrieben (182). Die Deletion des p28 Gens bewirkt eine starke Attenuierung von ECTV *in vivo*. *In vitro* ist p28 essentiell für die ECTV Replikation in peritonealen Makrophagen, nicht jedoch in verschiedenen anderen Zelltypen (183). Da das p28 Protein den Zell-Tropismus von ECTV beeinflusst, wird es zu den *host range* Faktoren der OPV gezählt (217).

Innerhalb der OPV ist das p28 Gen stark konserviert. Vollständige Homologe des ECTV p28 Gens finden sich bei VARV, CPXV, MPXV und verschiedenen anderen OPV. Bei den meisten VACV Stämmen ist der p28 ORF hingegen durch ein internes Stopcodon unterbrochen oder fehlt vollständig (93, 210). Ausnahmen sind der VACV Stamm IHD-W und das Kaninchenpockenvirus. Homologe Proteine finden sich auch in anderen Genera der *Chordopoxvirinae*, die Identität auf Aminosäureebene ist hier jedoch gering. Der hohe Grad

der Konservierung innerhalb der OPV lässt eine homologe Funktion der p28 Proteine verschiedener OPV vermuten. Die Bedeutung des p28 Proteins als Virulenz- bzw. *host range* Faktor wurde für andere OPV bisher jedoch nicht ermittelt.

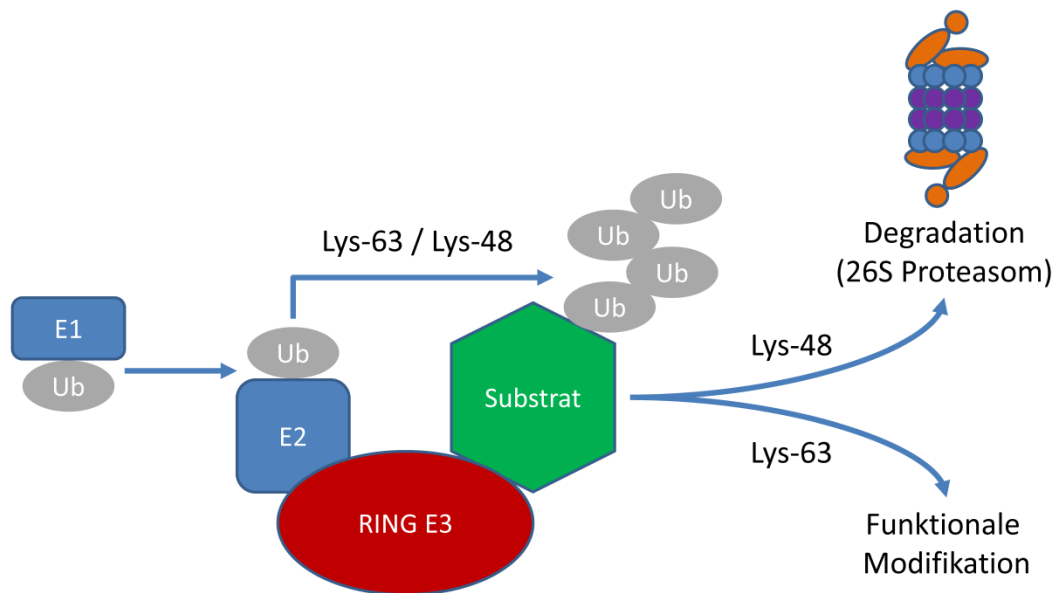
Das p28 Gen befindet sich bei den meisten OPV in den terminalen Genombereichen. Das Produkt des p28 Gens ist ein 28 kDa Protein, welches durch eine N-terminale Kila-N Domäne und ein RING-Finger Sequenz-Motiv (C3HC4) am C-Terminus charakterisiert ist. Die Kila-N Domäne hat möglicherweise DNA-bindende Aktivität. Das RING-Finger Motiv, eine spezifische Variante des Zink-Finger Motivs (74, 127), stellt eine konservierte cysteinreiche Aminosäuresequenz dar (21, 73, 178). Durch drei konservierte Cysteinpaare, sowie durch ein Cystein und ein Histidin wird jeweils ein Zink-Atom koordiniert. Die Struktur des RING-Finger Motivs mit gebundenen Zink-Atomen ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Struktur der RING-Finger Domäne** (nach (68)). Erläuterungen im Text.

Die genaue Funktion und Bedeutung der Kila-N Domäne ist unbekannt. Die C-terminale RING-Finger Domäne scheint hingegen essentiell für die Funktion von p28 als *host range* bzw. Virulenzfaktor des ECTV zu sein (182, 183). Die RING-Finger Domäne vermittelt die Funktion des p28 Proteins als E3-Ubiquitinligase (RING E3) (93, 150). RING E3s katalysieren in Kooperation mit E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen die Ubiquitinierung spezifischer Substrate. Die Art der Ubiquitinierung entscheidet, ob das Substrat dem Abbau über das Proteasom zugeführt wird, oder in seiner Funktion bzw. Lokalisierung beeinflusst wird. Sind die Moleküle einer Poly-Ubiquitinkette durch das Lysin 48 miteinander verknüpft, wird das Zielprotein hauptsächlich dem Abbau durch das Proteasom zugeführt (161). Die Verbindung durch Lysin 63 kann hingegen die Funktion des Proteinsubstrates modifizieren (59, 197). Der Vorgang der Ubiquitinierung ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt. *In vitro* kooperiert p28 sowohl mit zellulären E2-Enzymen, die an der Katalysierung von Lysin 48-Polyubiquitinierung beteiligt sind, als auch mit Enzymen, welche die Lysin 63-gekoppelte

Polyubiquitinierung vermitteln. Das p28 Protein könnte demzufolge sowohl die Degradierung, als auch eine Modifikation der Funktion oder Aktivität seiner Substrate vermitteln (93). Zelluläre oder virale Substrate wurden bisher jedoch nicht identifiziert. Es konnte aber gezeigt werden, dass p28 selbst sowohl durch Auto-Ubiquitinierung, als auch durch eine unbekannte Ubiquitinligase der proteasomalen Degradierung zugeführt wird (144).



**Abbildung 4: Vorgang der Ubiquitinierung durch RING-Finger E3-Ubiquitinligasen.** Der Mechanismus wird von drei Enzymen katalysiert. Ubiquitin (Ub) wird vom Ub-aktivierendem Enzym E1 auf das Ub-konjugierende Enzym E2 und von diesem über die RING-E3-Ub-Ligase auf das Zielprotein überführt.

Die genaue Funktion des p28 Proteins in infizierten Makrophagen ist unbekannt. Das Protein wird in der frühen Phase der viralen Replikation synthetisiert, bleibt während des gesamten Replikationszyklus bestehen und lokalisiert in infizierten Zellen innerhalb der Virusfabriken (183). Die Lokalisierung beruht möglicherweise auf der Assoziation mit dem viralen Genom, da die Bindung von DNA durch p28 beschrieben wurde (27). Studien mit ECTV-p28 und dem p28-Homolog des Shope Fibroma Virus (SFV) aus dem Genus Leporipoxvirus belegen die Involvierung des p28 Proteins in apoptotische Prozesse. Überexpression von SFV-p28 inhibiert die virusinduzierte Apoptose in VACV-infizierten BGMK-(*buffalo green monkey kidney*-)Zellen (27) und verstärkt die Inhibierung UV-induzierter Apoptose durch VACV in infizierten HeLa Zellen (26). Deletion des p28 Gens reduziert gleichermaßen die Fähigkeit von ECTV zur Inhibition UV-induzierter Apoptose in infizierten HeLa-Zellen. Der molekulare Mechanismus der Apoptoseinhibition durch p28 ist unbekannt. Weiterhin ist unbekannt, ob eine Apoptose-regulierende Aktivität des p28 Proteins der Funktion als *host range*- oder Virulenzfaktor zu Grunde liegt, bzw. ob die E3-Ubiquitinligaseaktivität für die anti-apoptotische Wirkung des Proteins benötigt wird.

## 1.5 Zielstellung

Kuhpockenviren, Affenpockenviren und Vaccinia Viren stellen die bedeutendsten Zoonose-Erreger innerhalb des Genus Orthopoxvirus dar. Diese Viren weisen teilweise große Unterschiede bezüglich ihres Wirtsbereichs und ihrer Pathogenität in verschiedenen Wirtsspezies auf. Zudem unterscheiden sie sich in ihrem Repertoire immunmodulatorischer Proteine. In dieser Arbeit soll die spezifische Reaktion einer humanen Zelllinie auf eine Infektion mit diesen Viren bzw. die Modulation der Wirtszelle durch diese drei Viren untersucht und verglichen werden. Hierzu soll(en):

- 1) Das Genexpressionsprofil humaner epithelialer (HeLa) Zellen nach Infektion mit Kuhpocken-, Affenpocken- oder Vaccinia Viren erfasst werden.
- 2) Die Modulation zellulärer Prozesse durch die Infektion bzw. die Wirtsantwort auf eine Infektion anhand eines Vergleichs der Genexpressionsprofile charakterisiert werden.
- 3) Virusspezies-spezifische Unterschiede identifiziert werden.
- 4) Die Regulation ausgewählter Gene auf mRNA und Proteinebene verifiziert werden.
- 5) Mögliche funktionale Konsequenzen der Genregulation identifiziert werden.

In diesem Teil der Arbeit wurden große Unterschiede in der Modulation immunregulatorischer Gene, vor allem zwischen Kuhpockenviren und Vaccinia Viren identifiziert. Insbesondere konnte *in vitro* eine starke Induktion mehrerer Cytokine und Chemokine durch Kuhpockenviren beobachtet werden, welche in einer Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen resultiert. Ausgehend von diesen Ergebnissen soll(en) weiterhin:

- 6) Die Replikationsfähigkeit von Kuhpockenviren auf Makrophagen untersucht werden.
- 7) Kuhpockenviren mit mutiertem p28 Gen konstruiert werden und die Bedeutung des p28 Proteins für die Replikation in Makrophagen untersucht werden.
- 8) Die Bedeutung Virus-induzierter Apoptose und p28-vermittelter Apoptose-Inhibition in Makrophagen untersucht werden.
- 9) Die Funktionsweise des p28 Proteins charakterisiert werden und putative zelluläre Interaktionspartner bzw. Substrate identifiziert werden.

## 2. Material & Methoden

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien des täglichen Laborbedarfs (wie z.B. Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, etc.), sowie Geräte, die zur üblichen Laborausstattung gehören (wie z.B. Tischzentrifugen, Schüttler, etc.) werden nicht gesondert aufgeführt. Spezielle Kits, Chemikalien oder Puffer sind in den Beschreibungen der einzelnen Methoden vermerkt.

### 2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

**Tabelle 3: Chemikalien**

Bezeichnung	Hersteller
Aminosäuren	Clontech-Laboratories
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Aureobasidin A	Clontech Laboratories
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Cethylmethylcellulose (CMC)	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
dNTP-Mix	Pharmacia
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Health Care
Formaldehyd, 16 %, Methanol-frei	Polysciences Europe
fötale Kälberserum	PAA
Glycerol (UltraPure™)	Invitrogen
Hefe-Extrakt	Sigma-Aldrich
Kanamycin-Sulfat	Sigma-Aldrich
L-(+)-Arabinose	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Gibco®, Life Technologies
Pepton	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	Gibco®, Life Technologies
Trypton	Sigma-Aldrich
X-α-Gal	Clontech Laboratories

**Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Hersteller
Elektroporationsküvetten LE (1 mm)	Peqlab Biotechnologie
E-Plate 96	Roche Diagnostics
Immobilon-P Transfer Membrane, 0,45 µm	Millipore
Mikrotiterplatten (6-, 12-, 24-, 96-Kavitäten)	TRP
Plastikwaren (Pipettenspitzen, etc.)	Eppendorf, Sarstedt, TRP
Precise Precast Protein Gels, 4-20 %, 10-/12-Well	Pierce (Thermo Fisher Scientific)
Precise Precast Protein Gels, 8-16 %, 10-/12-Well	Pierce (Thermo Fisher Scientific)
Sterilfilter (0,22 / 0,45 µm)	Roth, Sarstedt
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrat	Pierce (Thermo Fisher Scientific)
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Nunc



Tabelle 5: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
3500xL Dx Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Agilent Microarray Scanner System	Agilent Technologies
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Autoflex IV	Bruker Daltonics Analytical
Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss
BD LSRII Durchflusszytometer	BD Bioscience
ChemiDoc™ MP System	Bio-Rad Laboratories
Covaris™ S2 System	Covaris
E.A.S.Y. RH-3 Gel-Dokumentationssystem	Herolab
FastPrep® FP120 Homogenisator	MP Biomedicals
Fast Semi-Dry Blotter	Pierce (Thermo Fisher Scientific)
GenePulser Xcell™ Elektroporationssystem	Bio-Rad Laboratories
GS FLX Instrument	Roche Diagnostics
Horizon® 20×25 Gelkammer (20,0 × 25,0 cm)	Analytik Jena
Horizon® 58 Gelkammer (5,7 × 8,3 cm)	Analytik Jena
Infinite 200 PRO Microplate Reader	Tecan
MasterCycler® Gradient Thermozykler	Eppendorf
Mini-PROTEAN® III Elektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories
Mx3000P® QPCR System	Agilent Technologies
NanoDrop 1000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific
Spektrometer SpectraFluor Plus	Tecan Trading
xCELLigence™ RTCA SP	Roche Diagnostics

## 2.2 Bakterienstämme

Für Klonierungen wurde in dieser Arbeit der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm TOP10 verwendet. Die Transformation von Plasmiden erfolgte in chemisch-kompetente *One Shot® Top10* Zellen (Invitrogen). Die BAC-(*bacterial artificial chromosome*-)Mutagenese wurde in rekombinationskompetenten *E. coli* GS1783 Zellen durchgeführt. Der *E. coli* Stamm GS1783 ist ein Derivat des Stamms EL250 (117), verfügt aber über eine L-Arabinose induzierbare *I-sceI* Expressionskassette anstelle von *flpe*. Die Expression der Komponenten des Red-Rekombinationssystem ist Hitze-induzierbar bei 42°C. Alle verwendeten Stämme sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle
GS1783	DH10B $\lambda$ <i>cl857</i> $\Delta$ ( <i>cro-bioA</i> ) $\hookrightarrow$ <i>araC</i> -P <sub>BAD</sub> <i>I-sceI</i>	Gregory Smith, Ph.D.; Northwestern University, Chicago, IL
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i> $\lambda$ -	Invitrogen

## 2.3 Hefestämme

Es wurden die *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) Stämme Y2HGold und Y187 im *Yeast-2-Hybrid* (Y2H) *Screening*-Verfahren verwendet (s. Tabelle 7). Die jeweiligen Marker zur Selektion transformierter Hefen, sowie die Reportergene zur Selektion im Y2H *Screening* sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7: Hefestämme**

Stamm	Genotyp	Reporter	Marker	Quelle
Y187	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4<math>\Delta</math></i> , <i>gal80<math>\Delta</math></i> , <i>met-</i> , <i>URA3</i> : : <i>GAL1<sub>UAS</sub>-Gal1<sub>TATA</sub>-LacZ</i> , <i>MEL1</i>	<i>MEL<sub>1</sub></i> , <i>LacZ</i>	<i>trp1</i> , <i>leu2</i>	Clontech Laboratories
Y2HGold	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4<math>\Delta</math></i> , <i>gal80<math>\Delta</math></i> , <i>LYS2</i> : : <i>GAL1<sub>UAS</sub>-Gal1<sub>TATA</sub>-His3</i> , <i>GAL2<sub>UAS</sub>-Gal2<sub>TATA</sub>-Ade2</i> , <i>URA3</i> : : <i>MEL1<sub>UAS</sub>-Mell<sub>TATA</sub> AUR1-C MEL1</i>	<i>AbA<sup>r</sup></i> , <i>HIS<sub>3</sub></i> , <i>ADE<sub>2</sub></i> , <i>MEL<sub>1</sub></i>	<i>trp1</i> , <i>leu2</i>	Clontech Laboratories

## 2.4 Humane und tierische Zellen

In dieser Arbeit kamen sowohl etablierte Zelllinien, als auch Primärzellen zum Einsatz. Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8: Humane und tierische Zelllinien**

Zelllinie	Spezies	Zelltyp	Quelle
HEK 293T	<i>Homo sapiens</i>	Epithelzellen (Niere, embryonal), Adenovirus Typ 5 transformiert, SV40 T-Antigen exprimierend	ATCC #CRL-11268
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Epithelzellen (Cervix), Adenokarzinom, Papillomavirus-18 transformiert	ATCC #CCL2
HL60	<i>Homo sapiens</i>	Myeloblasten/Promyelocyten	ECACC #98070106
J774A.1	<i>Mus musculus</i>	Monocyten/Makrophagen, (Sarkom)	ATCC #TIB-67
NR8383	<i>Rattus norvegicus</i>	Makrophagen (alveolar)	ATCC #CRL-2192
Rat2	<i>Rattus norvegicus</i>	Fibroblasten (embryonal)	ATCC CRL- #1764
RAW264.7	<i>Mus musculus</i>	Makrophagen (Aszites), <i>Abelson murine leukemia virus</i> transformiert	ATCC #TIB-71
THP-1	<i>Homo sapiens</i>	Monozyten (Leukämie)	ATCC #TIB-202
Vero	<i>Chlorocebus sp.</i>	Fibroblasten (Niere)	ECACC #84113001

ATCC = American Type Culture Collection, ECACC = European Collection of Cell Cultures

## 2.5 Viren

In dieser Arbeit kamen sowohl verbreitet verwendete Referenzstämme, als auch Feldisolate zum Einsatz. Zudem wurden rekombinante Viren erzeugt und eingesetzt. Alle verwendeten Viren sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9: Viren**

Virus	Quelle / Referenz	Beschreibung
<b>Wildtyp-Viren:</b>		
CPXV Brighton Red (BR)	ATCC #VR-302	Isolat aus Hautläsion an der Hand eines Melkers, England, 1937 (61)
CPXV HumKre08/01	Feldisolat	Isolat aus Hautläsion nach Ratte-zu-Mensch Übertragung, Krefeld, 2008
Geflügelpockenvirus WP	Nobolis-PD, Intervet	Attenuierter Lebend-Impfstoff
VACV IHD-W	ATCC #VR-1441	Laborstamm (53)
VACV Lister / Elstree (LE)	ATCC #VR-1441	Impfstamm, replikationsfähiger Lebend-Impfstoff
VACV Western Reserve (WR)	ATCC #VR-1354	Laborstamm, Zellkultur-adaptiert
<b>Rekombinante Viren:</b>		
CPXV-BAC-WT	Bereitgestellt von Dr. B. K. Tischer (173)	Virus rekonstituiert aus einem BAC des CPXV BR Genoms
CPXV- $\Delta$ p28-Bln	Diese Arbeit	Mutante von CPXV-BAC-WT, <i>Knockout</i> des p28 Gens
CPXV-p28 <sup>+</sup> -BlnR	Diese Arbeit	Revertante von CPXV- $\Delta$ p28-Bln
CPXV-tp28-Sac	Diese Arbeit	Mutante von CPXV-BAC-WT, Trunkierung des p28 Gens
CPXV-p28 <sup>+</sup> -SacR	Diese Arbeit	Revertante von CPXV-tp28-Sac
CPXV-mp28-Mod	Diese Arbeit	Mutante von CPXV-BAC-WT, Modifizierung des p28 Gens
CPXV-p28 <sup>+</sup> -ModR	Diese Arbeit	Revertante von CPXV-mp28-Mod

ATCC = *American Type Culture Collection*

## 2.6 Nukleinsäuren

**Tabelle 10: Plasmide**

Plasmid	Quelle	Verwendung
pGBKT7	Clontech Laboratories	Y2H <i>Screening</i>
pGADT7-RecAB	Clontech Laboratories	Y2H <i>Screening</i>
pEPkan-S	Dr. B. K. Tischer, Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, D	BAC-Rekombination

**Tabelle 11: cDNA Bibliotheken**

Bibliothek	Quelle	Verwendung
Pretransformed Normalized Matchmaker™ Human Universal cDNA Library	Clontech Laboratories	Y2H <i>Screening</i>

**Tabelle 12: Primer und Sonden für die quantitative TaqMan® real-time PCR**

Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung
c-Myc F c-Myc R c-Myc Sonde	gCC AgA ggA ggA ACg AgC T ggg CCT TTT CAT TgT TTT CCA Fam-TgC CCT gCg TgA CCA gAT CC	Humanes Referenzgen
P4A F P4A R P4A Sonde	TAA TAC TTC gAT TgC TCA TCC Agg ACT TCT CAC AAA Tgg ATT TgA AAA TC Fam-TCC TTT ACg TgA TAA ATC AT-MGB	Pockenvirale Referenzsequenz
C11R F C11R R C11R Sonde	CggTgACTgTATCCACgCTAgAg AgCACAATACCKggAgATgggA Fam-CTACTAATACTAYATgCTgACATC-MGB	Frühe OPV Transkription
G8R F G8R R G8R Sonde	gTgTTYTACCgHggAgCCgA ATgAATgACggTTCTACCACAACAT Fam-CCTAATAggCATCAgTTCC-MGB	Mittlere OPV Transkription
F17R F F17R R F17R Sonde	gAACTgTAgAATgYgAaggAAgTAAAgC gCRAACATATTTTgTAgCAYgTCCg Fam-CCAgATgCgAgAgAAT-MGB	Späte OPV Transkription

Fam = 6-carboxyfluorescein; MGB = *minor groove binder*; (kommerziell erhältliche Genexpressions-Tests sind nicht aufgeführt)

**Tabelle 13: Primer für BAC-Mutagenese und Klonierung**

Primer	Sequenz
<b>BAC-Mutagenese:</b>	
BR023 Mod F	ACgATTAgAAAACgATAgATACTTTggTTTATTggATTCggCTAATgCT ATATTTgCCATAACAgCTATCAATATAgggATAACAgggTAATCgATTT
BR023 Mod R	ACgCACCggTTTCTCTTCgTgTTCTATgCCATATATTgATAgCTgTTATg gCAAATATAgCATTAgCCgAATCCgCCAgTgTTACAACCAATTAACC
BR023 Sac F	gAATgTggAATTTgCTATgAAgTTgTTTACTCAAAACgATAgAgCTCCT AAAgATACTTTggTTTATAgggATAACAgggTAATCgATTT
BR023 Sac R	AAAATATATgATTACACgAATCCAATAAACCAAAgTATCTTTAggAg CTCTATCgTTTTgAgTAAAgCCAgTgTTACAACCAATTAACC
BR023 Bln F	TTTAAAAAgTATTTACATTTTTTTCAGTgTTTAgTCgCggCCTAggAAT TTgATCCTACCAATAgggATAACAgggTAATCgATTT
BR023 Bln R	ATCTATAgATgATATATTgATTTTggTAGgATCAAATTCCTAggCCgCgA CTAAACAgTgAAgCCAgTgTTACAACCAATTAACC
<b>BAC-Rück-Mutagenese:</b>	
BR023 ModR F	ACgATTAgAAAACgATAgATACTTTggTTTATTggATTCgTgTAATCAT ATATTTTgCATAACATgTATCAATATAgggATAACAgggTAATCgATTT
BR023 ModR R	ACgCACCggTTTCTCTTCgTgTTCTATgCCATATATTgATACATgTTATg CAAAATATATgATTACACgAATCCgCCAgTgTTACAACCAATTAACC
BR023 SacR F	gAATgTggAATTTgCTATgAAgTTgTTTACTCAAAACgATTAgAAAAC gATAgATACTTTggTTTATAgggATAACAgggTAATCgATTT
BR023 SacR R	AAAATATATgATTACACgAATCCAATAAACCAAAgTATCTATCgTTT TCTAATCgTTTTgAgTAAAgCCAgTgTTACAACCAATTAACC
BR023 BlnR F	TTTAAAAAgTATTTACATTTTTTTCAGTgTTTAgTCgCggATATggAAT TTgATCCTACCAATAgggATAACAgggTAATCgATTT
BR023 BlnR R	ATCTATAgATgATATATTgATTTTggTAGgATCAAATTCCTAATCCgCgA CTAAACAgTgAAgCCAgTgTTACAACCAATTAACC
Fortsetzung auf der folgenden Seite.	

<b>Klonierung in pGBKT7 (Y2H Screening):</b>	
Y2Hp28 NdeI F	CATATggAATTtGATCCTAgCAAAATCAAT
Y2Hp28 NdeI R	CATATgTTAgTTAACTAgCTTATAgAACTTACTCATTgTTATg
<b>Sequenzierung (Y2H Screening &amp; BAC-Mutagenese):</b>	
pGBKT7 F	TAATACgACTCACTATAggg
pGBKT7 R	TTTTCgTTTTAAAACCTAAgAgTC
Y2H Insert F	CTATTCgATgATgAAgATACCCCAACCAAAC
Y2H Insert R	gTgAACTTgCggggTTTTTCAGTATCTACg
p28fullF1	ATggAATTtGATCCTAgCAAAATCAAT
p28fullR1	gTTAACTAgCTTATAgAACTTACTCATTgTTATg

## 2.7 Antikörper, Enzyme & Liganden

Tabelle 14: Primär- und Sekundär-Antikörper und Liganden

Antikörper / Ligand	Spezies	Quelle
<b>Primär-Antikörper:</b>		
$\alpha$ -Tubulin Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling technology #2144
$\beta$ -Aktin Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling technology #4967
Bax Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling technology #2772
Bcl-xL Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling technology #2762
eIF1b Antikörper	Kaninchen	Abcam #ab123681
GFP Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling technology #2555
GTSE1 Antikörper	Kaninchen	Abcam #ab83316
HCCA2 (MOB2) Antikörper	Kaninchen	Abcam #ab103109
ID1 Antikörper	Kaninchen	Antibodies-online Inc. #ABIN700330
Jab1/COPS5 Antikörper	Maus	Acris Antibodies #AM06040PU-N
OPV-L1R Antikörper	Kaninchen	Daniel Stern, Robert Koch-Institut
OPV-A33R Antikörper	Kaninchen	Daniel Stern, Robert Koch-Institut
SERPINB13 Antikörper	Kaninchen	Acris Antibodies #ARP42364_P050
Ubc13 Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling technology #4919
VACV Antikörper (FITC)	Kaninchen	Acris Antibodies #GTX19970
<b>Sekundär-Antikörper:</b>		
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	Cell Signaling technology #7074
Anti-Maus-HRP	Ziege	Cell Signaling technology #7076
<b>Liganden:</b>		
GM-CSF	Mensch	Sigma-Aldrich #H5666
M-CSF	Mensch	Sigma-Aldrich #H6916

Tabelle 15: Verwendete Enzyme

Enzym	Verwendung	Quelle
BlnI (AvrII)	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
SacI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
HindIII	Restriktionsendonuklease	Fermentas
Platinum Taq	DNA-Polymerase (PCR)	Invitrogen
RNaseA	RNA-Nuklease	Fermentas
SuperScript II RT	Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4 DNA Ligase	DNA Ligase	Fermentas

## 2.8 Molekularbiologische Kits

**Tabelle 16: Molekularbiologische Kits**

Bezeichnung	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
Agilent Quick Amp Labeling Kit	Agilent Technologies
BCA Protein Assay Kit	Pierce (Thermo Fisher Scientific)
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown Kit	Invitrogen
FastProtein™ Red Matrix Kit	MP Biomedicals
Fluorochrome Inhibitor of Caspases (FLICA)™ 660 Poly-Caspases Assay Kit	Immunochemistry Technologies
GS Rapid Library Prep Kits	Roche Applied Science
GS Rapid Library MID Adaptor Kits	Roche Applied Science
GS Titanium LV emPCR Kits	Roche Applied Science
GS Titanium PicoTiterPlate Kit 70x75	Roche Applied Science
GS Titanium Sequencing Kit XLR70	Roche Applied Science
Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System	Clontech Laboratories
NucleoSpin® Tissue DNA Extraction Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin® RNA II Total RNA Isolation Kit	Macherey-Nagel
Nucleospin® Plasmid QuickPure Kit	Macherey-Nagel
Peptide Calibration Kit II Standard	Bruker Daltonics Analytical
RPM® Yeast Plasmid Isolation Kit	MP Biomedicals
Turbo DNA-free™ Kit	Ambion
Yeastmarker™ Yeast Transformation System 2	Clontech Laboratories

Die verwendeten Kits sind auch in den Beschreibungen der einzelnen Methoden vermerkt.

## 2.9 TaqMan® Genexpressions-Tests

**Tabelle 17: Kommerziell erhältliche TaqMan® Genexpressions-Tests**

Zielgen	Test (Katalognummer)*	Hersteller
<i>CXCL1</i>	Hs00605382_gH	Applied Biosystems
<i>CXCL2</i>	Hs00601975_m1	Applied Biosystems
<i>CXCL3</i>	Hs00171061_m1	Applied Biosystems
<i>CCL20</i>	Hs01011368_m1	Applied Biosystems
<i>CSF2</i>	Hs00929873_m1	Applied Biosystems
<i>IL1A</i>	Hs00174092_m1	Applied Biosystems
<i>IL1B</i>	Hs01555410_m1	Applied Biosystems
<i>IL6</i>	Hs00985639_m1	Applied Biosystems
<i>IL8</i>	Hs00174103_m1	Applied Biosystems
<i>Ifna1, Ifna5, Ifna6</i>	Mm03030145_gH	Applied Biosystems
<i>Ifna2</i>	Mm00833961_s1	Applied Biosystems
<i>Ifnb1</i>	Mm00439552_s1	Applied Biosystems
<i>Ifng</i>	Mm01168134_m1	Applied Biosystems

\*Hs = *Homo sapiens*, Mm = *Mus musculus*

## 2.10 Puffer und Medien

Das Luria-Bertani-(LB-)Medium für *E. coli* wurde nach Green *et al.* (78), die Medien für *S. cerevisiae* nach (47) hergestellt. Für Festmedien wurden 20 g Agar auf 1000 ml Medium verwendet. Die aufgeführten Zusätze wurden den abgekühlten Medien nach dem Autoklavieren steril zugesetzt (A. bidest. = *Aqua bidestillatus*).

### 2.10.1 Puffer

#### 10x PBS, pH 7,4

80,0 g NaCl  
2,0 g KCl  
14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1000 ml A. bidest.

#### 10x TBS, pH 7,6

30,28 g Tris-Base  
87,66 g NaCl  
ad 1000 ml A. bidest.

### 2.10.2 Medien für die Anzucht von *E. coli*

#### LB-Medium

10,0 g NaCl  
10,0 g Trypton  
5,0 g Hefeextrakt  
ad 1000 ml A. bidest.

#### Zusätze für LB-Medium:

100 µg/ml Ampicillin  
30 µg/ml Kanamycin  
30 µg/ml Chloramphenicol  
2 % L-(+)-Arabinose  
40 µg/ml X-Gal

### 2.10.3 Medien für die Anzucht von *S. cerevisiae*

#### YPDA-Medium, pH 6,5

20 g Pepton  
10 g Hefeextrakt  
2 % Glukose  
0,003 % L-Adenin  
ad 1000 ml A. bidest.

#### Zusätze für SD-Medium:

20 mg/l L-Adenin Hemisulfat  
20 mg/l L-Arginin HCl  
20 mg/l L-Histidin HCl Monohydrat  
30 mg/l L-Isoleucin  
1 g/l L-Leucin  
30 mg/l L-Lysin HCl  
20 mg/l L-Methionin  
50 mg/l L-Phenylalanin  
2 g/l L-Threonin  
20 mg/l L-Tryptophan  
30 mg/l L-Tyrosin  
20 mg/l L-Uracil  
1,5 g/l L-Valin  
40 µg/ml X-α-Gal  
125 ng/ml Aureobasidin A

#### SD-Medium, pH 5,8\*

6.7 g Hefe-Stickstoff (Basis) (ohne Aminosäuren)  
2 % Glukose  
ad 1000 ml A. bidest.

\*Zugabe ausgewählter Aminosäuren, bzw. von Aureobasidin A (s. Zusätze).

### 2.10.4 Medien für die Zellkultur

#### Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), pH 7,4

DMEM Pulver, *High Glucose* (Gibco)  
3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>  
ad 1000 ml A. bidest.

#### Minimum Essential Medium (MEM), pH 7,2

MEM Powder (+Earle's Salze; Gibco)  
2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>  
ad 1000 ml A. bidest.

#### Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium, pH 7,2

RPMI Pulver (Gibco)  
2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub>  
ad 1000 ml A. bidest.

#### Zusätze für Zellkulturmedien:

5-10 % Fötales Kälberserum (FKS) (PAA)  
1 % L-Glutamin, 100x (Gibco)  
1 % Penicillin-Streptomycin, 100x (Gibco)

### 2.11 Software

**Tabelle 18: Spezielle Software**

Software	Hersteller
AxioVision v4.8.2	Carl Zeiss
Biotoools 3.2 Software	Bruker Daltonics Analytical
ClueGO v1.4	INSERM U872, Cordeliers Research Center
Cytoscape v2.8.2	Cytoscape Consortium
E.A.S.Y. RH-3	Herolab
EndNoteX5	Thomson Reuters
Feature Extraction Software v10.5.1.1.	Agilent Technologies
FlexAnalysis Software 3.3	Bruker Daltonics Analytical
FlowJo v9.4.11	Treestar Inc
Geneious Pro v5.4.3	Biomatters
GeneSpotter v4.0	MicroDiscovery
GraphPad Prism v5.00	GraphPad Software
MXPro - MX3000P v4.10 QPCR Software	Agilent Technologies
Newbler v2.6	Roche Diagnostics
ImageLab Software Version 4.0.1 build 6	Bio-Rad Laboratories
R v2.15.0	R-Project
Rosetta Resolver Gene Expression Data Analysis System	Rosetta Biosoftware
RTCA v1.2	Roche Diagnostics

Die verwendete Software ist auch in den Beschreibungen der einzelnen Methoden vermerkt.



## **2.12 Mikrobiologische Methoden**

### **2.12.1 Kultur und Anzucht von *E. coli***

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf LB-Festmedium oder in LB-Flüssigmedium bei 37°C bzw. bei 32°C im Fall von *E. coli* GS1783, welche bei der BAC-Rekombination verwendet wurden. Zur Anzucht der Schüttelkulturen in LB-Flüssigmedium wurden diese bei 220 rpm (*rounds per minute* = Umdrehungen pro Minute) und 37°C bzw. 32°C über Nacht (ü.N.) inkubiert. Durch Zugabe von Antibiotika zum Medium, konnte auf Stämme mit entsprechenden Resistenzgenen selektioniert werden.

### **2.12.2 Kultur und Anzucht von *S.cerevisiae***

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte bei 30°C auf YPDA-Festmedium oder in YPDA-Flüssigmedium oder auf verschiedenen SD-Selektionsmedien bei 30°C. Zur Anzucht der Schüttelkulturen in YPDA-Flüssigmedium wurden diese bei 220 rpm und 30°C ü.N. inkubiert. Durch Verwendung von SD-Selektionsmedien mit unterschiedlicher Aminosäure-Zusammensetzung oder durch Zugabe von Aureobasidin A zum Medium, konnte auf Stämme mit entsprechenden Prototrophien oder Resistenzgenen selektioniert werden.

## **2.13 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

Die molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, nach Green *et al.* durchgeführt (78).

### **2.13.1 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem *Nucleospin® Plasmid QuickPure Kit* (Macherey-Nagel). Die Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die isolierte Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

### **2.13.2 Extraktion von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae***

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte mit dem *RPM® Yeast Plasmid Isolation Kit* (MP Biomedicals) unter Verwendung des *FastPrep®-24 Systems* (MP Biomedicals) nach Herstellerangaben. Isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

### **2.13.3 Extraktion von Gesamt-DNA aus kultivierten Säugetierzellen**

Die Extraktion der Gesamt-DNA (zelluläre und virale DNA) aus kultivierten Zellen erfolgte mit dem *NucleoSpin® Tissue Kit* (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Die Lagerung isolierter DNA erfolgte bei -20°C.

#### 2.13.4 Extraktion von Gesamt-RNA aus kultivierten Säugetierzellen

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde mit dem *NucleoSpin® RNA II Kit* (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte RNA wurde direkt zur Synthese von cDNA eingesetzt, oder bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für die *Microarray*-basierte Genexpressionsanalyse wurde Gesamt-RNA mittels *Trizol®* Reagenz (Invitrogen) nach Herstellerangaben extrahiert und bei -80°C gelagert.

#### 2.13.5 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA (*complementary DNA*) wurden Oligo(dT) Primer verwendet, welche die polyadenylierten Enden der mRNA Moleküle binden. Die Reverse Transkription (RT) der mRNA in cDNA erfolgte mit der *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) nach dem Herstellerprotokoll, wobei jeweils ein Reaktionsansatz mit (RT<sup>+</sup>) und ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT<sup>-</sup>) erstellt wurde. Der RT<sup>-</sup> Ansatz erlaubt die Quantifizierung verbliebener DNA-Kontaminationen in den verwendeten RNA-Präparationen. Innerhalb einer Versuchsreihe wurden identische Mengen an Gesamt-RNA (1-2 µg / Reaktion) zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 2.13.6 Konzentrationsbestimmung gelöster Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Konzentration einer Lösung wurde spektralphotometrisch mit dem *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific) über die Absorption bei 260 nm bestimmt (1 OD<sub>260</sub> = 50 µg/ml dsDNA bzw. 44 µg/ml RNA). Die Reinheit der DNA bzw. RNA wurde anhand des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Für die *Microarray*-basierte Genexpressionsanalyse wurde die RNA Qualität und Integrität zudem mit dem *Agilent RNA 6000 Nano Kit* am *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) analysiert.

#### 2.13.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von Nukleinsäuren für die BAC-Mutagenese bzw. das *Yeast-2-Hybrid Screening* erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR (146, 176)). Hierzu wurde die *Platinum® Taq-Polymerase* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben verwendet. Die PCR-Zyklen wurden in einem *Mastercycler® Gradient* (Eppendorf) wie in Tabelle 19 angegeben durchgeführt.

Tabelle 19: PCR-Zyklen

	Reaktionsart	Zeit (sec)	Temperatur (°C)
1×	Initiale Denaturierung	600	94
45×	Denaturierung	30	94
	Hybridisierung	30	60
	Elongation	60	72
1×	Finale Elongation	300	72
1×	Ende	∞	4

### 2.13.8 Quantitative TaqMan® *real-time* PCR (qPCR)

Zur spezifischen Quantifizierung von DNA oder cDNA wird die quantitative *real-time* PCR (qPCR) im TaqMan® Format verwendet (126). Der erhaltene cT-Wert (*threshold cycle*) gibt Auskunft über die Menge an Matrizen-DNA-Molekülen in der Ausgangsprobe. Die Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes entspricht dem einer konventionellen PCR, bis auf den zusätzlichen Einsatz der Sonde. Die TaqMan® qPCR wurde im *Mx3000P® QPCR System* (Agilent Technologies) durchgeführt. Der Ablauf der PCR ist in Tabelle 20 wiedergegeben. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte während der Hybridisierungsphase. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der *MxPro™ ET QPCR Software* (Agilent Technologies). Teilweise wurden kommerziell erhältliche *TaqMan® Gene Expression Assays* (Life Technologies) verwendet (s. Tab. 17).

Tabelle 20: TaqMan® *real-time* PCR-Zyklen

	Reaktionsart	Zeit (sec)	Temperatur (°C)
1×	Initiale Denaturierung	600	94
40×	Denaturierung	15	94
	Hybridisierung	30	60
	Elongation	30	72

### 2.13.9 Vergleich der Genexpression mit der $\Delta\Delta cT$ -Methode

Die vergleichende cT-Methode oder  $\Delta\Delta cT$ -Methode erlaubt eine relative Quantifizierung der Genexpression in verschiedenen Proben, ausgehend von der TaqMan® qPCR. Bei der  $\Delta\Delta cT$  Methode wird keine Standardkurve benötigt, die Quantifizierung des Zielgens, normalisiert auf ein Referenzgen und in Relation zu einem Vergleichswert, erfolgt über die Formel:  $2^{-\Delta\Delta cT}$ . Als Referenzgen für die Normalisierung diente in dieser Arbeit das zelluläre *MYC* Gen (*c-Myc*). Die Normalisierung erfolgt durch Bildung des  $\Delta cT$  Werts nach der Formel:  $\Delta cT = cT_{Ziel} - cT_{Referenz}$ . Die Standardabweichung (s) des  $\Delta cT$  Werts wird nach folgender

Formel aus den Standardabweichungen der mittleren cT Werte des Zielgens ( $s_1$ ) und des Referenzgens ( $s_2$ ) berechnet:  $s = (s_1^2 + s_2^2)^{1/2}$ . Der  $\Delta\Delta cT$ -Wert wird nach folgender Formel berechnet:  $\Delta\Delta cT = \Delta cT_{\text{Test}} - \Delta cT_{\text{Vergleich}}$ . Dabei kann der  $\Delta cT_{\text{Test}}$  z.B. dem Wert in einer infizierten Probe entsprechen und der  $\Delta cT_{\text{Vergleich}}$  dem Wert in einer nicht-infizierten Probe. Die Standardabweichung des  $\Delta\Delta cT$ -Werts ist gleich der Standardabweichung des  $\Delta cT_{\text{Test}}$ -Werts. Zur Einbeziehung der Standardabweichung in die relative Quantifizierung über die Formel  $2^{-\Delta\Delta cT}$  wird die Standardabweichung des  $\Delta\Delta cT$ -Werts zuvor von diesem subtrahiert bzw. zu diesem addiert:  $2^{-(\Delta\Delta cT-s)}$  und  $2^{-(\Delta\Delta cT+s)}$ . Die erhaltenen Faktoren geben den Unterschied der Genexpression zwischen Test- und Vergleichsprobe als Spanne wieder.

#### 2.13.10 Sequenzierung von Nukleinsäuren nach Sanger

Zur Sequenzierung von DNA-Fragmenten nach Sanger *et al.* (1977) wurde das *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem *3500xL Dx Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) durch das Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts.

#### 2.13.11 Genomsequenzierung mittels *Next-Generation Sequencing*

Die Sequenzierung viraler Genome erfolgte mit dem *GS FLX Instrument* (Roche Applied Science) durch das Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts. Die DNA wurde mittels Ultraschall mit dem *Covaris S2 System* (Covaris) fragmentiert und eine DNA-Bibliothek mit Hilfe des *GS Rapid Library Prep Kits* unter Verwendung des *GS Rapid Library MID Adaptor Kits* nach Herstellerangaben erstellt. Die Amplifikation erfolgte mit dem *GS Titanium LV emPCR Kit (Lib-L) v2* nach Herstellerangaben. Für die Sequenzierung wurde das *GS Titanium Sequencing Kit XLR70* und ein *GS Titanium PicoTiterPlate Kit 70x75* verwendet (alle Kits: Roche Applied Science). Die Assemblierung der Sequenzdaten und die Trennung der, mittels *multiplex identifier* (MID) differenzierbaren, DNA-Bibliotheken erfolgte mit der *Newbler* Software (Roche Applied Science).

#### 2.13.12 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Zur Fragmentierung von DNA wurden spezifische Restriktionsendonukleasen (s. 2.7) nach den jeweiligen Herstellerprotokollen verwendet. Zum Einstellen der Reaktionstemperatur und zur thermischen Inaktivierung der Enzyme wurden ein Wasserbad oder ein *Thermomixer Comfort* Heizblock (Eppendorf) verwendet. Erhaltene DNA-Fragmente wurden zur Klonierung von Plasmiden verwendet oder in der Restriktionsfragmentlängenanalyse untersucht.

### **2.13.13 Restriktionsfragmentlängenanalyse**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Es wurden 0,8-2 %ige Agarosegele verwendet, die durch Aufkochen einer entsprechenden Agarosemenge in TAE-Puffer hergestellt wurden. Es wurden Horizontalgele verschiedener Dicke (ca. 2-5 mm) gegossen und nach dem Erkalten mit TAE-Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen an *6× DNA Loading Dye* (Fermentas) gemischt und aufgetragen. Als Größenstandard wurde die *Generuler 1 Kb DNA-ladder* (Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von ca. 120 mV durchgeführt. Die Färbung der DNA erfolgte mit Ethidiumbromid, die Detektion mit dem *E.A.S.Y. RH-3* Gel-Dokumentationssystem (Herolab).

#### TAE-(Tris-Acetat-EDTA-)Puffer

40 mM Tris/Essigsäure, pH 8,0

2 mM EDTA

### **2.13.14 Klonierung von DNA-Fragmenten**

Die Ligation PCR-amplifizierter, linearer DNA-Fragmente mit den linearisierten Hefe-Expressionsvektoren pGBKT7 oder pGADT7-RecAB erfolgte mit T4 DNA Ligase (Fermentas) über einen Zeitraum von 3 h bei Raumtemperatur (RT). Ein Teil des Ligationsansatzes wurde anschließend zur Transformation in *E. coli* eingesetzt. Alle konstruierten Plasmide wurden mittels Restriktionsfragmentlängenanalyse (2.13.13) und Sequenzierung (2.13.10) überprüft.

### **2.13.15 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Die Transformation von Plasmid-DNA erfolgte in chemisch-kompetente *E. coli* TOP10 Zellen (Invitrogen) mittels Hitzeschock nach Herstellerangaben. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte auf LB-Festmedium durch Antibiotikazugabe. Die Transformation von *E. coli* GS1783 mit BAC-DNA ist separat unter 2.15.1 beschrieben.

### **2.13.16 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA**

Die Transformation von Plasmid-DNA in *S. cerevisiae* erfolgte nach der Polyethylenglykol/Lithium-Acetat-Methode wie unter (47) beschrieben. Die transformierten Zellen wurden anschließend in 1 ml 0,9 % NaCl Lösung (w/v) resuspendiert und 100 µl von 1:10 und 1:100 Verdünnungen der Zellsuspension auf entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert und bei 30°C inkubiert.

## 2.14 *Microarray*-basierte Genexpression-Analyse

Die Durchführung der *Microarray*-Analysen (Amplifikation & Markierung der Proben, Hybridisierung, Auslesung der Rohdaten und initiale Datenanalyse) erfolgte durch die Firma Miltenyi Biotec, wie unter 2.14.1 und 2.14.2 beschrieben. Alle *Microarray* Daten wurden in der *Gene Expression Omnibus* (GEO) Datenbank hinterlegt und können unter dem Eintrag GSE36854 abgerufen werden.

### 2.14.1 Probenvorbereitung & Hybridisierung

Alle Arbeitsschritte erfolgten nach dem *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* Protokoll (Agilent Technologies, Version 5.7, Herstellernummer: G4140-90040). Jeweils 1 µg jeder Gesamt-RNA Probe wurde im Amplifikations- und Markierungsschritt eingesetzt. Es wurde das *Quick Amp Labeling Kit* (Agilent Technologies) zur Markierung mit dem Cyanfarbstoff 3-CTP (Cy3) verwendet. Der cRNA (*complementary RNA*) Ertrag und die Aufnahme rate des Farbstoffs wurden mit dem *NanoDrop 1000* Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die Hybridisierung der cRNA mit dem *Whole Human Genome Oligo Microarrays 4×44K* (Agilent Technologies) erfolgte mit 1,65 µg der Cy3-markierten und fragmentierten cRNA über Nacht (17 h) bei 65°C.

### 2.14.2 Auslesung & Datenanalyse

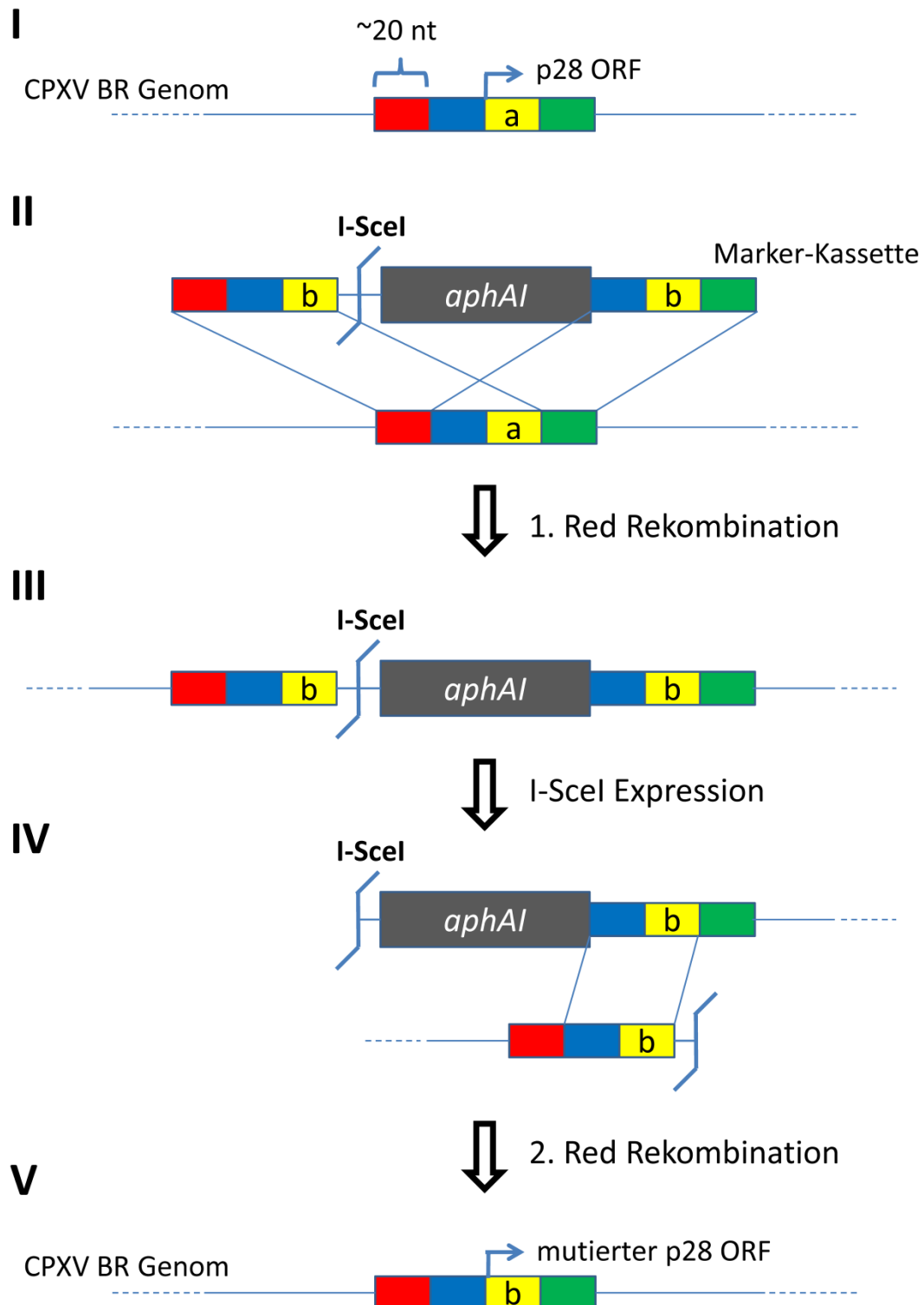
Fluoreszenzsignale der hybridisierten *Microarrays* wurden mit dem *Microarray Scanner* System (Agilent Technologies) detektiert. Die Auslesung und Verarbeitung der Daten erfolgte mit der *Feature Extraction Software* (FES) v10.5.1.1 (Agilent Technologies). Zur Bestimmung der differentiellen Genexpression wurden die generierten Daten mit dem *Resolver Gene Expression Data Analysis* System (Rosetta Biosoftware, *Rosetta error model* (216)) analysiert. Es wurden die normalisierten Signalintensitäten der infizierten Proben durch die der nicht-infizierten Kontrolle dividiert. Die Normalisierung der Signalintensitäten erfolgte zuvor durch Division der Intensitäten durch ihren Median. Die Auswahl relevanter Gene basiert auf einer mindestens zweifachen Regulierung und einem p-Wert  $\leq 0,01$ . Die Daten der Replikate wurden durch paarweise Berechnung der log-Quotienten und ihrer Fehler und anschließende Kombination zu einem Quotienten über eine Fehler-gewichtete Durchschnittsberechnung ermittelt. Zur Visualisierung der Daten wurden *heat maps* der normalisierten Signalintensitäten mit der Softwareumgebung R v2.15.0 (R-Project) erstellt.

### 2.14.3 Zuordnung identifizierter Gene zu biologischen Prozessen

Die Zuordnung von Genen zu biologischen Prozessen und die Analyse auf Überrepräsentation dieser Prozesse wurde mit der Software *Cytoscape* 2.8.2 (Cytoscape Consortium) in Kombination mit dem Plugin *ClueGO* v1.4 (INSERM U872, Cordeliers Research Center) durchgeführt (18, 195). Die Analyse basierte auf Zuordnungen der *Gene Ontology* Datenbank vom 06.02.2012 (9). Zur Identifizierung signifikant überrepräsentierter Prozesse wurde ein zuvor empirisch ermittelter Schwellenwert definiert ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ; Mindestanteil  $\geq 10\%$  der annotierten Gene eines Prozesses; Mindestanzahl von 6 Genen pro Prozess). Verwandte Prozesse wurden in funktionalen Gruppen zusammengefasst um die Redundanz der Ergebnisse zu verringern. Der signifikanteste Prozess wurde dabei als *group leading term* definiert. Der Verbindungsgrad verschiedener Prozesse wird über  $\kappa$  Statistik errechnet und der  $\kappa$  Wert für die Definition funktionaler Gruppen verwendet.

### 2.15 BAC-Mutagenese über *en passant* Rekombination

Die Mutagenese von Sequenzabschnitten des CPXV BR BACs erfolgte wie von Tischer *et al.* beschrieben (204). Das Verfahren ist in Abbildung 5 dargestellt. Das Red-Rekombinationssystem wurde zur Insertion eines linearen DNA-Fragments (Transferkassette) in eine Zielsequenz auf dem BAC verwendet (Abb. 5 I). Die Konstruktion der Kassetten erfolgte mittels PCR unter Verwendung der unter 2.6 angegebenen Primer zur BAC-Mutagenese, ausgehend von dem Plasmid pEPkan-S als *Template*. Die Rekombination wurde durch homologe Sequenzabschnitte von ca. 60 bp Länge vermittelt (kodiert in den 5' Enden der PCR-Primer), welche die gewünschten Punktmutationen tragen. Die homologen Sequenzabschnitte flankierten ein Kanamycin-Resistenzgen (*aphA1*), welches als Marker zur positiven Selektion rekombinanter BACs in *E. coli* diente. Zur späteren Entfernung des Selektionsmarkers dienten eine Sequenzduplikation in den flankierenden homologen Sequenzen der Marker-Kassette, sowie eine angrenzende I-SceI Restriktionsschnittstelle. Im ersten Schritt wurde die gesamte Marker-Kassette in die Zielsequenz inseriert (Abbildung 5 II). Die Rekombinanten (Abbildung 5 III) wurden über Antibiotika-Resistenz selektiert und korrekte Co-Integrate über PCR (s. 2.13.7), Restriktionsfragmentlängenanalyse (s. 2.13.13) und Sanger-Sequenzierung (s. 2.13.10) überprüft. Anschließend wurde die Expression der I-SceI Nuklease induziert, welche die integrierte Sequenz in der I-SceI Schnittstelle spaltete. Die entstehenden freien DNA-Enden mit angrenzenden duplizierten Sequenzen dienten als Substrat für eine 2. Red Rekombination (Abbildung 5 IV), welche die Marker-Kassette entfernte und die mutierte Zielsequenz hinterließ.



**Abbildung 5: BAC-Mutagenese** (modifiziert nach (204)). I – Zielsequenz, II – Rekombination zwischen dem PCR Produkt der Marker-Kassette und der Zielsequenz, III – Co-Integrat, IV – Expression von I-SceI in *E.coli* generiert ein Substrat für eine 2. Red Rekombination zwischen den duplizierten Sequenzen, V – mutierte Genomsequenz. Rote, blaue, gelbe und grüne Boxen = identische Sequenzen von ca. 20 bp Länge, *aphAI* = Kanamycin-Resistenzgen, I-SceI = I-SceI Restriktionsschnittstelle, a = Wildtyp-Zielsequenz, b = mutierte Zielsequenz.



### 2.15.1 Transformation von *E. coli* GS1783 zur Red-Rekombination

Zur Erstellung von elektroporationskompetenten *E. coli* GS1783 Zellen wurden am Vortag der Transformation Flüssigkulturen in LB-Medium (3 ml) angeimpft und ü.N. bei 32°C und 220 rpm inkubiert. Am Folgetag wurde eine neue LB-Flüssigkultur (5 ml) im Verhältnis 1:50 mit der ü.N.-Kultur beimpft und diese bis zum Erreichen einer  $OD_{600} = 0,5-0,7$  inkubiert (32°C, 220 rpm). Zur Induktion der Expression der Komponenten des Red-Rekombinationssystems wurde die Flüssigkultur anschließend im Schüttelwasserbad bei 220 rpm auf 42°C erhitzt und 15 min inkubiert. Die Kulturen wurden daraufhin für 20 min im Eiswasserbad unter Schütteln (220 rpm) abgekühlt und die Bakterien anschließend sedimentiert (4.500×g, 5 min, 4°C). Der zellfreie Kulturüberstand wurde sofort dekantiert und verworfen, das Bakterienpellet erneut kurz zentrifugiert (4.500×g, 15 sec, 4°C) und der verbliebene Kulturüberstand verworfen. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml 10 % Glycerol in A. bidest. (eiskalt) vorsichtig resuspendiert und in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Bakterien wurden erneut sedimentiert (5.000×g, 1 min, 4°C) und in 1 ml 10 % Glycerol gewaschen (5.000×g, 1 min, 4°C), der Kulturüberstand sofort dekantiert und die Bakterien im verbleibenden 10 % Glycerol vorsichtig resuspendiert (ca. 50 µl). Die nun rekombinations- und elektroporationskompetenten Bakterien wurden bis zur Elektroporation auf Eis gelagert. Zur Transformation wurden ca. 100 ng linearer DNA (PCR-Produkt) in einem vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 50 µl der Bakteriensuspension zugegeben. Die Suspension wurde sofort in eine vorgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette (Pepylab Biotechnologie) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 15 kV/cm, 25 µF und 200 Ω mit dem *Gene Pulser Xcell Electroporation System* (Bio-Rad Laboratories). Die Bakteriensuspension wurde sofort nach der Elektroporation in 1 ml LB-Medium (32°C, ohne Antibiotika) aufgenommen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1-2 h bei 32°C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Festmedien ausplattiert. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch Antibiotikazugabe (30 µg/ml Chloramphenicol, 30 µg/ml Kanamycin). Die Platten wurden über 1-2 Tage bei 32°C inkubiert.

### 2.15.2 Identifizierung positiver Co-Integrate

Rekombinante Klone wurden über die Chloramphenicol- und Kanamycin-Resistenz und mittels Kolonie-PCR mit den Primern p28fullF1 und p28fullR1 (s. 2.6) identifiziert. Eine Integration der Marker-Kassette in den p28 ORF konnte über die Größe des PCR-Produkts nachgewiesen werden. Die Vollständigkeit der als BAC klonierten Virusgenome und der

Erfolg der Rekombination wurden anschließend mittels Restriktionsfragmentlängenanalyse untersucht (s. 2.13.13). Hierzu wurde die BAC-DNA aus identifizierten Klonen isoliert und mittels der Restriktionsenzyme HindIII (bei CPXV-mp28-Mod und CPXV-p28<sup>+</sup>-ModR) bzw. BlnI (bei CPXV-Δp28-Bln und CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR), oder SacI (bei CPXV-tp28-Sac und CPXV-p28<sup>+</sup>-SacR) nach Herstellerangaben verdaut. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte auf einem 1 % Agarosegel (30 cm Länge) bei 40 V über Nacht. Das erhaltene Restriktionsmuster wurde mit dem erwarteten Muster aus dem *in silico* Verdau in der Software *Geneious Pro v5.4.3* (Biomatters) verglichen.

### 2.15.3 Extraktion von BAC-DNA

Zur Extraktion von BAC-DNA aus *E. coli* GS1783 wurden 2 ml einer ü.N.-Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert (11.000×g, 1 min, RT). Das Sediment wurde in 100 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Puffer P2 zugeben, durch Invertieren gemischt und nach 5 min Inkubation 150 µl Puffer P3 zugeben und erneut vorsichtig gemischt. Die Proben wurden 5 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (11.000×g, 5 min, RT). Die Überstände wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die DNA durch Zugabe von 450 µl Isopropanol und Zentrifugation (11.000×g, 10 min, RT) gefällt. Das Sediment wurde in 200 µl 70% Ethanol gewaschen (11.000×g, 10 min, RT), getrocknet und in 30 µl TE Puffer + RNaseA (Fermentas) gelöst (37°C, ca. 30 min). Die Lagerung der BAC-DNA erfolgte bei 4°C.

<u>Puffer P1</u>	<u>Puffer P2</u>	<u>Puffer P3</u>	<u>TE + RNaseA</u>
50 mM Glukose	200 mM NaOH	3 M Kaliumacetat	10 mM Tris-HCl,
25 mM Tris-HCl,	1% SDS	5 M Essigsäure	pH 8,0
pH 8,0			1 mM EDTA, pH 8,0
10 mM EDTA,			40 µg/mL RNaseA
pH 8,0			

### 2.15.4 Auflösen der Co-Integrate (2. Red Rekombination)

Zum Auflösen der Co-Integrate wurden ü.N.-Kulturen von ausgewählten Klonen mit Co-Integrat in 3 mL LB-Medium mit 30 µg/ml Chloramphenicol und 30 µg/ml Kanamycin erstellt (32°C, 220 rpm). Am folgenden Tag wurden frische 1 ml Kulturen in LB-Medium mit 30 µg/ml Chloramphenicol mit 20 µl der Übernachtskultur angeimpft (1:50). Die Kulturen wurden 1-2 h inkubiert (32 °C, 220 rpm) bis die Kultur sich leicht eintrübte. Anschließend wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 30 µg/ml Chloramphenicol und 2 % L-(+)-Arabinose zur Induktion der I-SceI Expression zugegeben. Durch die Restriktion an der I-SceI-Schnittstelle entstanden freie DNA-Enden, so dass durch eine 2. Red-Rekombination

die Markerkassette entfernt werden konnte. Die Kultur wurde 1 h inkubiert (32°C, 220 rpm) und zur Induktion des Red-Rekombinationssystems anschließend auf 42°C erhitzt (30 min, 220 rpm). Die Kultur wurde für 2-3 h inkubiert (32°C, 220 rpm) bevor je 10 µl einer 1:100 und einer 1:1000 Verdünnung auf LB-Platten mit 30 µg/ml Chloramphenicol und 1% L-(+)-Arabinose ausplattiert wurden. Die Platten wurden für 1-2 Tage bei 32°C inkubiert.

### **2.15.5 Identifizierung positiver Mutanten und Rekonstitution**

Es wurden Kolonien Chloramphenicol-resistenter Klone in Kultur genommen (3 ml LB-Medium + 30 µg/ml Chloramphenicol) und ü.N. inkubiert (32°C, 220 rpm). Rekombinante Klone wurden mittels Replica-Plattierung identifiziert. Hierzu wurden die Klone parallel auf LB-Platten mit 30 µg/ml Chloramphenicol und auf LB-Platten mit 30 µg/ml Chloramphenicol + 30 µg/ml Kanamycin ü.N. kultiviert (32°C). Nach Entfernung der Marker-Kassette wachsen Klone mit aufgelöstem Co-Integrat nicht mehr unter Selektionsdruck durch Kanamycin. Vollständige rekombinante Klone wurden wie unter 2.15.2 beschrieben über Kolonie-PCR, Restriktionsfragmentlängenanalyse und Sequenzierung identifiziert und verifiziert. Zur Rekonstitution von infektiösen Viren wurde die BAC-DNA in Vero Zellen transfiziert (s. Punkt 2.17.3). Es wurden 4 µg BAC-DNA zur Transfektion von ca.  $4 \times 10^5$  Zellen verwendet. Nach 2 h Inkubation unter Kulturbedingungen wurden je 100 µl Virus-Stock eines Geflügelpockenvirus (*Fowlpox virus*, FPXV) als Helfervirus zugegeben, welches auf Vero Zellen nicht replikationskompetent ist. Nach 2-3 Tagen Inkubation wurden GFP-exprimierende Plaques gepickt und die Viren auf Vero Zellen angezogen. Die Verifizierung der Mutationen erfolgte mittels Sequenzierung.

## **2.16 Analyse von Protein-Protein Interaktion**

### **2.16.1 Yeast-2-Hybrid Screening**

Die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen im *Yeast-2-Hybrid* (Y2H) *Screening* erfolgte mit dem *Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System* in Verbindung mit der *Mate & Plate™ Library - Universal Human (Normalized)* (beide: Clontech Laboratories). Das Y2H *Screening* wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierzu wurde das Köderprotein über den Hefe-Expressionsvektor pGBKT7 im Hefestamm Y2H Gold (Mat a) exprimiert. Für das Y2H *Screening* wurde eine Kreuzung („*mating*“) mit dem, die Bibliothek exprimierenden Stamm Y187 (Mat α) und die anschließende Selektion wie im Herstellerprotokoll beschrieben, durchgeführt. Positive Klone wurden durch zweifache Selektion auf Aminosäure-Prototrophie (Trp, Leu, Ade, His) und Aureobasidin A-Resistenz identifiziert.

Bei selektierten Klonen wurde das exprimierte zelluläre Protein durch Sanger-Sequenzierung des ORFs im Bibliotheks-Expressionsvektor pGADT7-RecAB identifiziert.

### 2.16.2 Pull-down Analyse

Die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen im *Pull-Down* Verfahren erfolgte mit dem *Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown Kit* (Invitrogen). Als Fängermolekül wurde rekombinant in *E. coli* exprimiertes CPXV BR p28 Protein (Genexpress) verwendet, welches über einen Polyhistidin-Tag an die *beads* gekoppelt wurde. Es wurden 40 µg p28 Protein pro 1 mg *beads* verwendet. Die Kopplung erfolgte wie im Herstellerprotokoll beschrieben. Zur *Pull-down* Reaktion wurden Proteinextrakte von J774A.1 Zellen verwendet. Es wurden ca.  $1 \times 10^7$  J774A.1 Zellen durch Abschaben in Suspension gebracht, in PBS gewaschen (400×g, 5 min, 4°C) und in 1 ml *Pull-down* Lysepuffer lysiert (15 min, auf Eis) und Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt (16.100×g, 10 min, 4°C). Je 700 µl Proteinextrakt wurden mit je 2 µg *beads* mit gebundenem p28 Protein inkubiert (10 min, RT). Als Kontrolle dienten *beads* ohne gebundenes p28 Protein. Ungebundenes Protein wurde durch 4-maliges Waschen mit *Pull-down* Lysepuffer entfernt und die gebundenen Proteinkomplexe durch Erhitzen der *beads* in Proteinladepuffer (*Lane Marker Reducing Sample Buffer*, Pierce) eluiert (5 min, 95°C) und zur Analyse mittels SDS-PAGE aufgetrennt, bzw. bei -80°C gelagert.

#### Bindungs- / Wasch-Puffer

50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0  
300 mM NaCl  
0,01 % Tween-20

#### Pull-down Lysepuffer

3,25 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4  
70 mM NaCl  
0,01 % Tween-20  
1 % NP-40  
5 % Glycerol

## 2.17 Zytologische Methoden

### 2.17.1 Zellpassagen

Sämtliche Arbeiten für die Zellkultur wurden innerhalb einer sterilen Sicherheitswerkbank der Klasse II in einem S2-Labor durchgeführt. Es erfolgte eine strenge räumliche Trennung von infizierten und nicht infizierten Kulturen. Alle verwendeten Zelllinien wurden, je nach Flaschengröße (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 175 cm<sup>2</sup>), in 5 ml, 20 ml oder 30 ml des entsprechenden Mediums bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Im Abstand von 2-3 Tagen wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden adhären-wachsende Zellen nach Waschen mit PBS durch Inkubation mit Trypsin/EDTA abgelöst oder mit einem Zellschaber abgeschabt und schließlich im Medium resuspendiert. Danach wurde ein Teil dieser Suspension 1:10 in eine neue Kulturflasche mit Medium überführt.

### **2.17.2 Zellen einfrieren und auftauen**

Um Zellen einzufrieren, wurden adhären-wachsende Zellen zunächst abgelöst. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (400×g, 10 min, 4 °C) und in Dimethylsulfoxid-(DMSO-)haltiges Medium (10 % DMSO, 90 % FKS) aufgenommen. Die Zellen wurden in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gelagert. Für weitere Verwendungen wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut und in frischem Medium aufgenommen. Um das, für einige Zelllinien toxische, DMSO zu entfernen, wurden die Zellen zuvor sedimentiert (400×g, 10 min, 4 °C) und in Kulturmedium gewaschen (400×g, 10 min, 4 °C).

### **2.17.3 Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA**

Zur Transfektion mit Plasmid-DNA wurden Zellen am Vortag der Transfektion ausgesät und ü.N. bei Kulturbedingungen (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert, so dass diese vor der Transfektion zu 90 % konfluent waren. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Kulturmedium erneuert. Die Transfektion wurde mit dem *FuGene HD* Transfektionsreagenz (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz in Serum-freiem OptiMEM I Medium (Gibco) gelöst. Nach ca. 12-14 h Inkubation wurde das Zellkulturmedium ausgewechselt.

### **2.17.4 Isolierung primärer peritonealer Makrophagen**

Zur Isolierung primärer Makrophagen aus dem Peritoneum wurden ca. 3 Monate alte männliche Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*) verwendet. Die Tiere wurden mit Isofluran (Baxter) euthanasiert und das Abdomen mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Haut über dem Abdomen wurde mit einem Einschnitt entlang der Mittellinie eröffnet und die Bauchwand freigelegt. Anschließend wurden 50 ml PBS (eiskalt) durch einen Einstich durch die Bauchwand in die Peritonealhöhle injiziert. Die Peritonealflüssigkeit wurde anschließend wieder entnommen. Die aus der Peritoneallavage gewonnenen Zellen wurden pelletiert (400×g, 10 min, 4°C) und in DMEM (Gibco) mit 10 % FKS (PAA), 0,1 % L-Glutamin (Gibco), sowie 50 U Penicillin und 50 µg Streptomycin (Gibco) aufgenommen und kultiviert. Nach 3 h Inkubation bei Kulturbedingungen wurden nicht-adhärierte Zellen durch 3-maliges Waschen mit PBS entfernt und frisches Medium zu den Zellen gegeben.

### **2.17.5 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)**

Zur Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) wurde *Buffy-Coat* als Ausgangsmaterial verwendet (DRK-Blutspendedienst Ost). Zur Aufreinigung der PBMCs wurden je 10 ml Ficoll-Paque™ PLUS (GE Health Care) in ein

50 ml Zentrifugationsröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 40 ml *Buffy-Coat* überschichtet. Zur Auftrennung der Bestandteile des *Buffy-Coats* im Dichtegradienten wurde das Gemisch zentrifugiert (800×g, 20 min, RT) und die PBMC-Schicht in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll-Schicht abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die isolierten PBMCs wurden anschließend dreimal in PBS (1:4) gewaschen (400×g, 10 min, 4°C). Sollte eine weitere Aufreinigung von CD14<sup>+</sup> Monozyten aus den PBMCs erfolgen (s. 2.17.6), so wurden die PBMCs in MACS-Puffer (1:20) resuspendiert.

### 2.17.6 Isolierung primärer CD14<sup>+</sup> Monozyten aus PBMCs

Die Isolierung von primären CD14<sup>+</sup> Monozyten aus PBMCs erfolgte mittels MACS® Technologie über positive Selektion von CD14<sup>+</sup> Monozyten. Hierzu wurde die PBMC Präparation (aus Punkt 2.17.5) zunächst zur Entfernung von Zellaggregaten vorgefiltert (*Pre-Separation Filters*, 30 µm). Anschließend erfolgte die Bindung der CD14<sup>+</sup> Monozyten in der Suspension mittels *CD14 MicroBeads* nach Herstellerangaben. Die magnetische Isolierung der gebundenen CD14<sup>+</sup> Monozyten erfolgte mit dem *MidiMACS® Separator* über *LS Columns* (alles: Miltenyi Biotec). Die Isolierung wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die isolierten Zellen wurden in R10-Medium aufgenommen und kultiviert (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mit dem *MC CD14 Monocyte Cocktail* (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben mittels Durchflusszytometrie am *BD LSR II* Durchflusszytometer (BD Bioscience) kontrolliert.

#### R10-Medium

10 % FKS  
2 mM L-Glutamin  
10 mM HEPES  
50 µM 2-Mercaptoethanol  
in RPMI1640, pH 7,2

#### MACS-Puffer

0,5 % bovines Serum-Albumin (BSA)  
2 mM EDTA, pH 8,0  
in PBS

### 2.17.7 Differenzierung von CD14<sup>+</sup> Monozyten zu Makrophagen

Die isolierten CD14<sup>+</sup> Monozyten (siehe Punkt 2.17.6) wurden direkt nach der Isolierung in R10-Medium in Zellkulturplatten ausgesät (1×10<sup>6</sup> Zellen/ml). Zur Differenzierung der CD14<sup>+</sup> Monozyten zu M1 bzw. M2 Makrophagen wurden dem Medium 50 ng/ml GM-CSF bzw. 50 ng/ml M-CSF zugegeben (beides: Sigma-Aldrich). Zugabe von GM-CSF stimuliert die Bildung von M1 Makrophagen, M-CSF die von M2 Makrophagen. Die Zellen wurden über 6 Tage bei Kulturbedingungen inkubiert, wobei am 2., 4. und 6. Tag dem Medium erneut je 50 ng/ml GM-CSF bzw. M-CSF zugegeben wurden.

### 2.17.8 Chemotaxis-Test

Die chemotaktische Aktivität von Zellkulturüberständen wurde mit dem *QCM Chemotaxis Cell Migration Assay* (Millipore) untersucht. Der Test erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden Membranen mit einer Porengröße von 5 µm bzw. 3 µm zur Messung der Migration von U937 Zellen bzw. von HL-60 Zellen (je  $1 \times 10^5$  Zellen) verwendet. Die Analyse der Migration erfolgte nach 16 h Inkubation unter Kulturbedingungen. Als Stimuli und Kontrollen dienten Zellkulturüberstände und frisches Zellkulturmedium. Nach der Lyse migrierter Zellen erfolgte die relative Quantifizierung der Migration über den Nukleinsäurefarbstoff *CyQuant GR* (Molecular Probes) anhand der Intensität des Fluoreszenzsignals. Die Datenanalyse erfolgte mit dem *Infinite 200 PRO Microplate Reader* (Tecan).

### 2.17.9 Zellanalyse durch Impedanzmessung im *xCELLigence* System

Die Impedanzmessung mit dem *xCELLigence* System (Roche Diagnostics) wurde zur Analyse des Zellstatus in Echtzeit verwendet. Die Zellen wurden dazu in speziellen Mikrotiterplatten (*E-plates*) kultiviert. Der Boden der Kavitäten der *E-Plates* ist mit Leitungen zur Widerstandsmessung beschichtet. Veränderungen der Impedanz, ausgelöst durch Änderungen der Zellzahl, Morphologie oder Adhäsion, wurden während des Versuchsablaufs in Echtzeit beobachtet und aufgezeichnet und erlauben im Gegensatz zur Endpunktanalyse Aussagen über den kompletten Verlauf eines Versuchs. Der Status der Zellen wurde anhand des dimensionslosen Zellindex (CI) wiedergegeben (10). Die Verwendung der Impedanzmessung zur Analyse einer OPV-Infektion erfolgte nach Witkowski *et al.* (221).

### 2.17.10 Analyse aktiver Caspasen in der Durchflusszytometrie

Zur Detektion und Quantifizierung der Apoptose in intakten Zellen wurden Fluorochrom-konjugierte Caspase-Inhibitoren zur Färbung aktiver Caspasen verwendet. Es wurde das *Fluorochrome Inhibitor of Caspases (FLICA)<sup>TM</sup> Poly-Caspases Assay Kit* (Immunochemistry Technologies) zur Pan-Caspase Detektion verwendet. Die Färbung adhärenter Zellen erfolgte in 24-Kavitäten Mikrotiterplatten. Hierzu wurden ca.  $1 \times 10^5$  Zellen pro Kavität ausgesät und über Nacht unter Kulturbedingungen kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen infiziert und nach der Virusadsorption in 300 µl frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Zum gewünschten Zeitpunkt erfolgte die Färbung durch Zugabe von je 2 µl der konzentrierten Färbelösung (150×) zum Zellkulturmedium. Nach 1 h Inkubation bei Kulturbedingungen wurden die gefärbten Zellen abgelöst und in 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäße überführt. Waschschrte und Fixierung der Zellen erfolgten nach Herstellerangaben. Die Detektion gefärbter Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie am *BD LSR II* Durchflusszytometer

(BD Bioscience). Die 660-VAD-fmk-Fluoreszenz wurde nach Anregung mit dem 633 nm Laser im A647-Kanal detektiert. Zellpopulationen mit aktiven Caspasen wurden anhand des Vergleichs der Signalintensität zu Kontrollzellen ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *FlowJo v9.4.11* (Treestar Inc).

## **2.18 Virologische Methoden**

### **2.18.1 Infektion**

Zur Infektion wurden Zellen subkonfluent in Zellkulturplatten oder -flaschen ausgesät, so dass diese am folgenden Tag zu 80-90 % konfluent waren. Die Virusstammlösung wurde, entsprechend der Zellzahl und der angestrebten Anzahl infektiöser Partikel (*plaque forming units*, PFU) pro Zelle (= *multiplicity of infection*, MOI) in Kulturmedium verdünnt. Bei nicht-infizierten Kontrollen wurde eine Scheininfection (*Mock-Infektion*) durch Zugabe von Virus-freiem Medium durchgeführt. Die Zellen wurden 1 h bei Kulturbedingungen in der verdünnten Virusstammlösung inkubiert. Um eine Beeinflussung durch eventuell im Virus-*Stock* vorhandene biologisch-aktive Faktoren, wie z.B. Cytokine zu begrenzen, wurde das Inoculum 1 h nach Infektion abgenommen und die Zellen vor Zugabe frischen Mediums 3× in PBS gewaschen. Anschließend wurden die infizierten Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen. Die Infektionsdauer richtete sich nach dem Versuchsziel.

### **2.18.2 Virusanzucht**

Die Virusanzucht erfolgte auf HeLa-Zellen in 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen. Bei 80-90 % Konfluenz wurden die Zellen infiziert und ca. 4-5 Tagen bei Kulturbedingungen kultiviert. Sobald eine vollständige Infektion aller Zellen durch mikroskopische Beurteilung des cytopathischen Effekts (CPEs) festgestellt werden konnte, wurden die Zellen durch dreimaliges Einfrieren bei -80°C und anschließendes Auftauen bei RT aufgebrochen. Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (500×g, 10 min, 4°C) abgetrennt. Der virushaltige Überstand wurde bei -80°C gelagert. Die Bestimmung des Titers erfolgte mithilfe des Plaque-Titrationstests (2.18.4).

### **2.18.3 Virusaufreinigung**

Die virushaltigen Zelllysate (aus Punkt 2.18.2) wurden zur Konzentrierung der Viruspartikel mittels Ultrazentrifugation durch ein Zuckerkissen aufgereinigt. Weiterhin wurden dadurch Zelltrümmer und biologisch-aktive Faktoren (z.B. Cytokine) aus den Viruspräparationen entfernt. Es wurden hierzu 5 ml 30 % Saccharose-Lösung (0,45 µm sterilfiltriert) in *SW40Ti*



Ultrazentrifugen-Röhrchen (BD Bioscience) vorgelegt und vorsichtig mit der Virussuspension aufgefüllt. Die Ultrazentrifugation wurde bei 30.000×g und 4°C für 1 h durchgeführt (*Optima™ L-100K*, Beckman-Coulter). Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Viruspartikel in einem möglichst geringen Volumen PBS (ca. 100 µl) resuspendiert.

#### 2.18.4 Plaque-Titrationstest

Die Bestimmung des Virus-Titers einer Lösung wurde mittels Plaque-Titrationstest (mod. nach (87)) durchgeführt. Infektiöse Viruspartikel werden direkt durch entstehende zellfreie Regionen, sogenannte Plaques, in einem konfluenten Zellrasen nachgewiesen. Der Test wurde auf Vero Zellen durchgeführt. Es wurden  $1,0 \times 10^5$  Vero Zellen pro Kavität einer 24-Kavitäten Zellkulturplatte in 500 µl DMEM-Kulturmedium ausgesät und ü.N. bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium durch 200 µl frisches Medium ersetzt. Es wurde eine dekadische Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Virussuspension mit Verdünnungen bis 1:10<sup>8</sup> in Kulturmedium erstellt und jeweils 200 µl der Virusverdünnung pro Kavität hinzugegeben und gemischt. Die Titration erfolgte im vierfachen Ansatz. Nach 4 h Inkubation bei Kulturbedingungen wurden die Zellen mit je 400 µl 1,6 %-iger Carboxymethylcellulose überschichtet. Nach 3-4 Tagen Inkubation bei Kulturbedingungen wurde das Medium abgenommen und die Zellen 20 min in 4 % Formaldehyd fixiert. Nach der Färbung intakter Zellen mit 0,1 % Naphtol(blau)schwarz Färbelösung für 10 min wurden die Zellen mit Leitungswasser gespült und die ungefärbten Plaques ausgezählt. Die Anzahl infektiöser Viruspartikel pro ml Virussuspension wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung berechnet und in „Plaque Forming Units“ (PFU) angegeben:

$$\text{Titer} \left( \frac{\text{PFU}}{\text{ml}} \right) = \frac{\sum \text{Plaques} \times \text{niedrigste auszählbare Verdünnung}}{\sum \text{eingesetztes Volumen}}$$

##### Überschichtungsmedium

1,6 % Carboxymethylcellulose  
in Zellkulturmedium

##### Naphtol(blau)schwarz Färbelösung

1,0 g Naphtol(blau)schwarz  
13,6 g Natriumacetat  
60,0 ml Eisessig  
ad 1000 ml A.bidest.

#### 2.18.5 Detektion infizierter Zellen mittels Immunfluoreszenz-Test (IFT)

Immunfluoreszenz-Tests (IFTs) wurden verwendet, um den Infektionsgrad einer Kultur zu bestimmen. OPV-IFTs wurden mit einem Fluoresceinisothiocyanat-(FITC-)konjugierten Kaninchen anti-VACV Antikörper (Acris Antibodies) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Carl Zeiss). Zur Immundetektion pockenviraler

Proteine wurden Zellen auf Deckgläschen (Ø 12mm) kultiviert. Vor der Färbung wurden die Zellen in 4 % Formaldehyd (in PBS) fixiert (20 min, RT), 2× in PBS gewaschen und mit 0,1 % Triton-X (in PBS) permeabilisiert (10 min, RT). Die Präparate wurden 2× mit PBS gewaschen und mit dem Primärantikörper (1:100 in PBS, 2 % BSA) inkubiert (1 h, 37°C). Anschließend wurden die Präparate 3× mit PBS gewaschen und die Proben in *Fluorescence Mounting Medium* (Dako) eingebettet.

## **2.19 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.19.1 Proteinextraktion aus *S. cerevisiae***

Zur Erstellung eines Proteinextrakts aus einer *S. cerevisiae* Kultur wurde das *FastProtein™ Red Matrix Kit* (MP Biomedicals) mit dem *FastPrep®-24* System (MP Biomedicals) nach Herstellerangaben verwendet. Die Proteinextrakte wurden bei -80°C gelagert.

### **2.19.2 Proteinextraktion aus Säugerzellen**

Zur Proteinextraktion aus kultivierten Zellen wurde RIPA Puffer (Pierce) nach Herstellerangaben zur Lyse der Zellen verwendet. Zur Inhibierung endogener Proteasen und Phosphatasen wurde der *Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail* (Pierce) dem Lysepuffer vor der Anwendung hinzugegeben. Unlösliche Komponenten wurden durch Zentrifugation (16.000×g, 10 min, 4°C) abgeschieden. Die Lagerung von Proteinextrakten erfolgte bei -80°C.

### **2.19.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellkulturextrakten erfolgte mittels Biuret-Test mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Pierce) nach Herstellerprotokoll. Die Messung der Absorption bei 562 nm erfolgte mit dem *Infinite 200 Pro Microplate Reader* (Tecan). Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardkurve errechnet.

### **2.19.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in vertikalen Proteingelkammern (*Protean III* System, Bio-Rad Laboratories) in Tris-HEPES-SDS Laufpuffer durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurden entweder die *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas) oder die *SuperSignal Molecular Weight Protein Ladder* (Pierce) verwendet. Die Proteinextrakte wurden 1:5 in Proteinladepuffer aufgenommen (*Lane Marker Reducing Sample Buffer*, Pierce), welcher Dithiothreitol (DTT) als Reduktionsmittel enthält, und zur vollständigen Denaturierung der Proteine erhitzt (5 min,

95°C). Zur Auftrennung der Proteine in der Gelelektrophorese wurden die denaturierten Proteinextrakte auf kommerziell erhältliche SDS-Polyacrylamid-Gele (*Precise Protein Gels*, Pierce) mit einem Polyacrylamid-Gradienten von 8-16 % oder 4-20 % aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80-150 mV.

Tris-HEPES-SDS Laufpuffer, pH 8,0

0,1 M Tris-Base

0,1 M HEPES

3 mM SDS

in A.bidest.

### **2.19.5 Proteinfärbung im SDS-Polyacrylamid-Gel**

Zur direkten Färbung von aufgetrennten Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel wurden das *Pierce Silver Stain Kit for Mass Spectrometry* (Pierce) oder der *Flamingo™ Fluorescent Gel Stain* (Biorad) nach Herstellerangaben verwendet. Die Aufnahme von Durchlichtbildern der Silber-gefärbten Gele und die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgten mit dem *ChemiDok MP* System (Bio-Rad Laboratories). Für nachfolgende massenspektrometrische Analysen von Proteinen wurden die Gele in 1 % Essigsäure bei 4°C gelagert.

### **2.19.6 Western-Blot und Immundetektion**

Der Transfer von Proteinen im Western-Blot wurde nach dem *Semi-Dry* Verfahren mit dem *Fast Semi-Dry Blotter* (Pierce) durchgeführt. Die ungefärbten SDS-Polyacrylamid-Gele wurden nach der Elektrophorese 10 min in A. bidest. inkubiert und anschließend für 10 min in Transfer-Puffer (*Fast Semi-Dry Transfer Buffer*, Pierce) äquilibriert. Die für den Transfer verwendeten PVDF Membranen (*Immobilon-P Transfer Membrane*, 0,45 µm, Millipore) wurden zuerst 5 min in Methanol aktiviert. Anschließend wurden Membranen und Filterpapier (Whatman) für 15 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei 25 V über 15 min. Die Membranen wurden anschließend 5 min in TBS-T gewaschen und freie Bindestellen der Membran unspezifisch durch 30 min Inkubation mit Block-Puffer (*StartingBlock T20 (TBS) Blocking Buffer*, Pierce) gesättigt. Die Immundetektion mit dem Primärantikörper erfolgte ü.N. bei 4°C unter Schütteln (ca. 100 rpm) in Block-Puffer. Ungebundene Antikörper wurden anschließend durch Waschen der Membran (3×10 min in TBS-T) entfernt. Die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte für 1 h bei RT in Block-Puffer unter Schütteln (ca. 100 rpm). Nach dem Waschen der Membran (3×10 min in TBS-T) erfolgte die Detektion des sekundären Antikörpers über Chemolumineszenz mit dem *SuperSignal West Dura Maximum Sensitivity Substrate* (Pierce) nach Herstellerangaben. Die Detektion der Chemolumineszenzsignale erfolgte mit dem

*ChemiDok MP* System (Bio-Rad Laboratories). Für die Auswertung wurde die Software *ImageLab* (Version 4.0.1 *build* 6, Bio-Rad Laboratories) verwendet.

#### TBS-T, pH 7,5

0,05 % Tween-20  
in TBS-Puffer (1×)

### **2.19.7 Identifizierung von Proteinen in der Massenspektrometrie**

Die Identifizierung von Proteinen in der Massenspektrometrie erfolgte durch die Abteilung ZBS6 des Robert Koch-Instituts. Zur Identifizierung von aufgetrennten Proteinen nach der SDS-PAGE wurden diese im Gel in einzelne Peptide verdaut. Hierzu wurden einzelne Spots aus dem Gel ausgestochen. Die Probenvorbereitung wurde durchgeführt wie in (185) beschrieben. Die Peptide wurden mit dem *Autoflex IV* massenspektrometrisch untersucht, welches über die *FlexAnalysis Software 3.3* gesteuert wird. Das MALDI-ToF/ToF Massenspektrometer (MS) wurde dabei zunächst mit dem *Peptide Calibration Kit II Standard* (alle: Bruker Daltonics Analytical) extern kalibriert. Anschließend wurden im „positiv Ionen Modus“ bei einer Laserfrequenz von 500 Hz 500 Einzelspektren zu einem *peptide mass fingerprint* im Massenbereich zwischen 800 und 4000 Da addiert. Das resultierende MS1 Spektrum wurde intern mit der *FlexAnalysis Software 3.3* durch einen Abgleich mit der *PeakErazor* Liste (90) bei einer Massentoleranz von 100 ppm kalibriert und die entsprechenden Hintergrund *peaks* aus der *m/z* Liste entfernt. Die 10 stärksten übrigen *m/z* Werte im Massenbereich zwischen 800 und 4000 Da wurden für die Aufnahme von LIFT Spektren, die jeweils aus 200 Einzelspektren akkumuliert werden, ausgewählt. Die Proteinidentifizierung ( $p < 0,05$ ) erfolgte über die Abfrage der zu einer Datei kombinierten MS1 und LIFT Spektren gegen die *Swissprot* Datenbank (Stand 02.07.2012) mittels der *Biotoools 3.2 Software* (Bruker Daltonics Analytical). Als feste Modifikation wurde eine Carbamidomethylierung an Cysteinresten und als variable Modifikation eine Oxidation an Methioninresten vorgegeben. Die erlaubte Zahl an *missed cleavages* des Trypsins betrug 1. Die Massentoleranzen der mit dem SNAP Algorithmus bei einem Signal zu Rausch Grenzwert von 3 identifizierten *peaks* für die MS1 Spektren betrug 100 ppm und für die LIFT Spektren 1,5 Da.

### **2.20 Analyse der Cytokin-Sekretion *in vitro***

Zur Messung von Cytokin-Konzentrationen im Zellkulturüberstand wurden zellfreie Überstände durch Zentrifugation (600×g, 5 min, 4°C) der Überstände erstellt. Die zellfreien

Überstände wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert bzw. direkt im *Proteome Profiler Array* (2.20.1) oder im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA, 2.20.2) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Vergleichbarkeit der Resultate zwischen verschiedenen Proben wurde durch die Verwendung gleicher Zellzahlen garantiert.

### **2.20.1 *Proteome Profiler*<sup>TM</sup> Antikörper-Array**

Zur parallelen Bestimmung der relativen Cytokin-Konzentrationen im Zellkulturüberstand wurden multiplex Antikörper-Arrays verwendet. Zur Messung der Cytokin-Konzentrationen im Überstand humaner Zellen wurde der *Proteome Profiler Human Cytokine Array, Panel A* (R&D Systems) verwendet. Bei Überständen muriner Zellen wurde der *Proteome Profiler Mouse Cytokine Array, Panel A* (R&D Systems) verwendet. Unverdünnte zellfreie Zellkulturüberstände wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Zur Entwicklung über Chemolumineszenz wurde das *SuperSignal West Dura Maximum Sensitivity Substrate* (Pierce) nach Herstellerangaben verwendet. Die Detektion der Chemolumineszenzsignale erfolgte mit dem *ChemiDok MP* System (Bio-Rad Laboratories). Zur Auslesung der Daten und Korrektur von Hintergrundsignalen wurde die Software *GeneSpotter* v4.0 (MicroDiscovery) verwendet. Zur Normalisierung der Signalintensitäten wurden diese durch die Signalintensitäten der Referenzspots dividiert.

### **2.20.2 ELISA**

Die absolute Quantifizierung von Cytokin-Konzentrationen im Zellkulturüberstand mittels ELISA erfolgte unter Verwendung der *Quantikine*® ELISA Kits *Human CXCL8/IL-8 Immunoassay*, *Human IL-6 Immunoassay* oder *Human CXCL1/GRO $\alpha$  Immunoassays* (R&D Systems). Zellfreie Zellkulturüberstände wurden im ELISA nach Herstellerangaben eingesetzt. Verdünnungen wurden nur, soweit im Herstellerprotokoll vorgesehen, durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte mit dem *Infinite 200 Pro Microplate Reader* (Tecan). Die Cytokin-Konzentration wurde anhand einer Standardkurve errechnet.

### 3. Ergebnisse

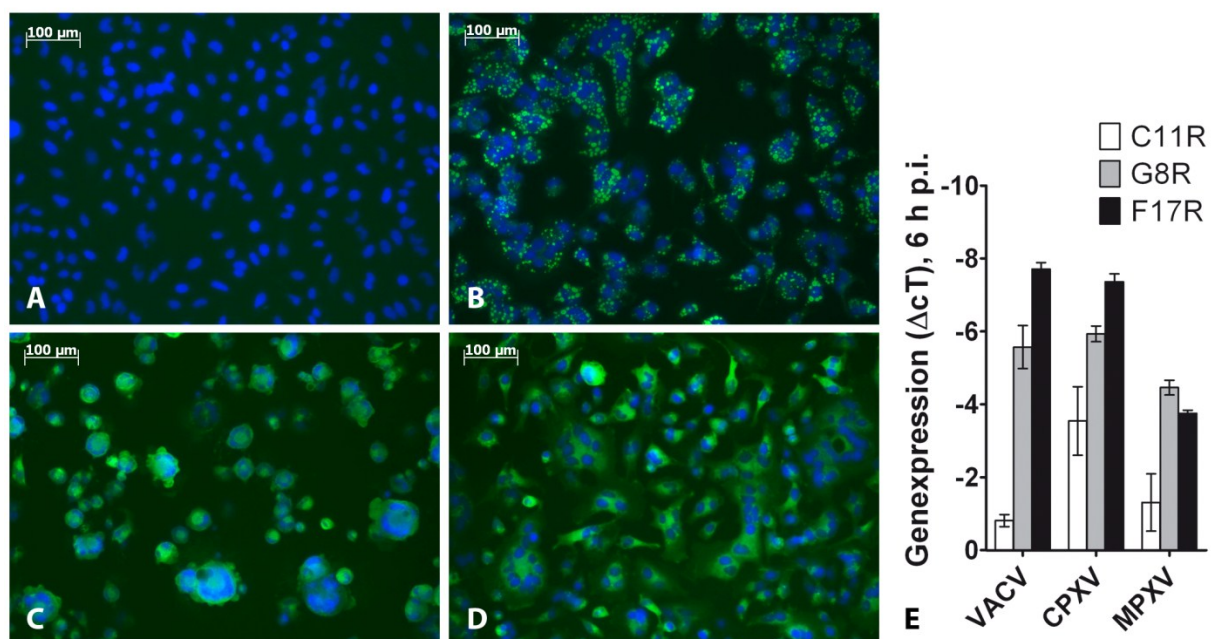
#### 3.1 Vergleichende Analyse des Genexpressionsprofils OPV-infizierter Zellen

Obwohl VACV, CPXV und MPXV nah verwandte OPV darstellen, unterscheiden sie sich beträchtlich bezüglich ihres Wirtsbereichs und ihrer Pathogenität in verschiedenen Spezies. Diese Differenzen können auf verschiedenen Ebenen der Infektion entstehen. Prinzipiell lässt sich der Verlauf einer Virusinfektion auf drei Ebenen unterteilen. Die unterste Ebene stellt die einzelne infizierte Zelle dar, darauf folgen die Ausbreitung in einzelnen Geweben und schließlich die Ausbreitung auf den ganzen Organismus und die Übertragung auf weitere Individuen. Aufgrund ihrer Zugänglichkeit zu molekularbiologischen Untersuchungen wird im Folgenden die unterste Ebene, die der infizierten Zelle, zur vergleichenden Analyse einer VACV-, CPXV- oder MPXV-Infektion herangezogen. Hierzu sollte ein Genexpressionsprofil infizierter humaner Zellen erstellt werden.

##### 3.1.1 Etablierung der Infektionsbedingungen

Zur Untersuchung des Genexpressionsprofils wurden HeLa Zellen als Wirtszelle ausgewählt, da sie eine hohe Suszeptibilität gegenüber OPV-Infektionen aufweisen. Weiterhin wurden HeLa Zellen bereits in früheren Studien zur Biologie der OPV und zur Charakterisierung von Veränderungen der Genexpression der Wirtszelle nach einer OPV-Infektion verwendet (80, 81, 116, 129, 223). Zur Infektion wurden der VACV Stamm IHD-W, der CPXV Stamm Brighton Red (BR) und der MPXV Stamm MSF-6 verwendet. Die vergleichende Genexpressionsanalyse sollte sowohl den generellen Einfluss einer OPV-Infektion auf das Genexpressionsprofil der Wirtszelle, als auch Virus-spezifische Muster einzelner OPV aufzeigen. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, wurde zunächst die Permissivität der Zelllinie für alle drei ausgewählten OPV untersucht. Hierzu wurden HeLa Zellen mit einer hohen MOI von 5 PFU/Zelle mit VACV, CPXV oder MPXV infiziert und der Fortschritt der Infektion nach 24 h mittels Immunfluoreszenztest (IFT) untersucht. Der Infektionsgrad wurde anhand der Färbung später viraler Proteine mit einem kreuzreaktiven FITC-konjugierten anti-VACV Antikörper bestimmt. Wie in Abb. 6A-D zu erkennen, ist der Infektionsgrad 24 h nach Infektion mit VACV, CPXV oder MPXV vergleichbar, mit einer annähernd vollständigen Infektion des Zellrasens. Nach einer CPXV-Infektion sind charakteristische Einschlusskörperchen zu erkennen, während nach VACV- oder MPXV-Infektion eine diffuse zytoplasmatische Färbung vorherrscht. Im Vergleich zu CPXV- oder MPXV-Infektion, zeigen VACV-infizierte Zellen eine ausgeprägte Bildung von Syncytien und

eine stärkere Abrundung der Zellen. Die Permissivität der HeLa Zellen gegenüber einer Infektion mit VACV, CPXV und MPXV scheint gegeben zu sein, angezeigt durch die in allen Fällen erfolgende, fortschreitende Synthese später viraler Proteine. Durch die hohe MOI scheint zudem die Gleichmäßigkeit und Synchronität der Infektion gewährleistet zu sein. Dies wurde auch durch den Nachweis der Expression früher, mittlerer und später viraler Gene mittels qPCR bestätigt. Zum Zeitpunkt 6 h p.i. konnte nach Infektion mit VACV, CPXV oder MPXV die Expression des späten Transkriptionsfaktors VLTF-1 (G8R Gen) als Nachweis der mittleren Transkription und des späten 11 kDa *virion core* Proteins (F17R Gen) als Nachweis der späten Transkription detektiert werden (Abbildung 6E).

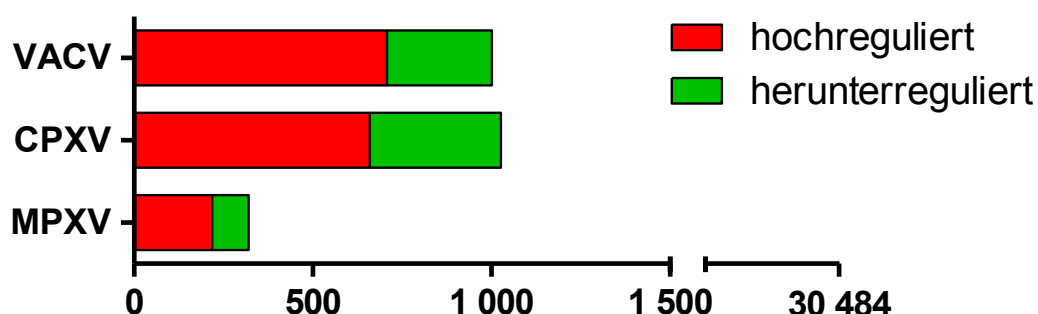


**Abbildung 6: Infektion von HeLa Zellen.** Dargestellt sind nicht-infizierte (A), sowie CPXV BR- (B), VACV IHD-W- (C) oder MPXV MSF-6-infizierte HeLa Zellen (D). Die Zellen wurden mit einer MOI = 5 infiziert und der Infektionsgrad 24 h p.i. mittels Färbung infizierter Zellen mit einem FITC-konjugierten anti-VACV Antikörper untersucht (grüne Fluoreszenz). Als Gegenfärbung diente die Färbung der Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff DAPI (blaue Fluoreszenz). Zudem wurde die Expression des frühen viralen C11R Gens, des mittleren Gens G8R und des späten Gens F17R zum Zeitpunkt 6 h p.i. mittels qPCR untersucht (E). Dargestellt sind die durch Normalisierung auf die Expression des zellulären *MYC* Gens erhaltenen  $\Delta cT$  Werte. Beide Analysen zeigen einen vergleichbaren Infektionsverlauf.

Zur Analyse des Genexpressionsprofils infizierter HeLa Zellen (s. 2.14) wurde der Zeitpunkt 6 h p.i. gewählt, unter anderem aufgrund des teilweise ausgeprägten CPEs der infizierten Zellen 24 h nach Infektion. Alle hierzu extrahierten RNAs wiesen mit RIN-(*RNA integrity*-) Werten von 9,9 bis 10 eine hohe RNA Qualität auf.

### 3.1.2 Die Mehrheit der zellulären Gene bleibt von der Infektion unbeeinflusst

Die Analyse des zellulären Genexpressionsprofils mit dem *Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays 4x44K* (Agilent Technologies) umfasst Expressionsdaten, die mit 41.094 Sonden generiert werden, von denen 30.484 in 19.288 bekannten humanen Genen und Transkripten binden. Für jede Probe wurden zwei unabhängige biologische Replikate analysiert. Die Normalisierung und Auswertung der Daten erfolgte wie unter 2.14.2/3 beschrieben. Ausgehend von den Expressionsdaten der nicht-infizierten HeLa Zellen, wurde nach zellulären Genen gesucht, welche im Mittel eine mindestens zweifache Hoch- oder Herunterregulierung nach Infektion mit VACV, CPXV oder MPXV zeigten und deren Signalintensitäten signifikant ( $p < 0,01$ ) über dem Hintergrund lagen. Wie in Abb. 7 gezeigt, wurde insgesamt nur ein geringer Teil der untersuchten zellulären Gene nach Infektion in ihrer Expression beeinflusst, während der Großteil ( $> 96\%$ ) keine Unterschiede aufwies. Dieser geringe Einfluss auf die zelluläre Genexpression war besonders drastisch nach einer MPXV-Infektion zu beobachten. Während nach einer VACV-Infektion 1.002 Transkripte (3,3 %) und nach einer CPXV-Infektion 1.027 Transkripte (3,7 %) eine entsprechende Diskrepanz zu nicht-infizierten Zellen zeigten, waren es nach Infektion mit MPXV lediglich 321 Transkripte (1,1 %). Ein Großteil dieser regulierten Transkripte wies dabei eine Hochregulierung als Folge der Infektion auf. So zeigten von den 1.027 CPXV-regulierten Transkripten 660 (64,3%) eine mehr als zweifache Hochregulierung und nur 367 Herunterregulierung in Folge der Infektion. Diese Verteilung war bei MPXV mit 219 (68,2%) hochregulierten und 102 herunterregulierten Transkripten und bei VACV mit 708 (70,7%) hochregulierten und 294 herunterregulierten Transkripten vergleichbar.



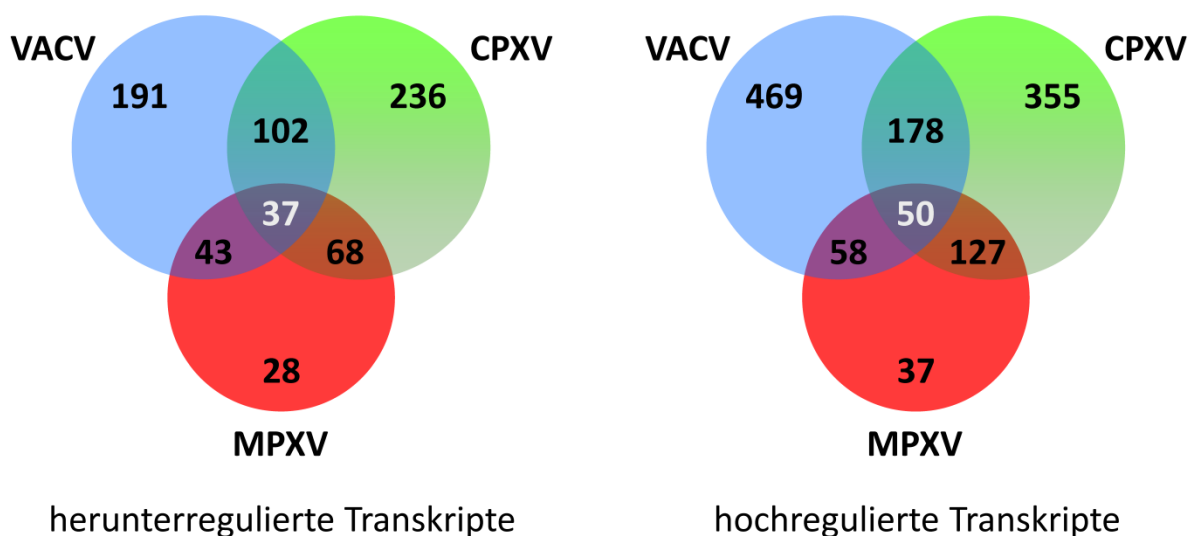
**Abbildung 7: Anzahl induzierter und reprimierter Transkripte nach Infektion.** Dargestellt ist die Anzahl der Wirtszell-Transkripte, welche im Vergleich zu nicht infizierten Zellen nach Infektion mit VACV, CPXV oder MPXV in der *Microarray*-Analyse mindestens um den Faktor 2 hoch- oder herunterreguliert wurden. Nur ein geringer Teil der untersuchten zellulären Transkripte wurde nach Infektion in ihrer Expression beeinflusst, insbesondere nach MPXV-Infektion. Hierbei überwiegt eine Induktion zellulärer Transkripte durch die Infektion.



### 3.1.3 Der Einfluss auf die zelluläre Genexpression ist Virus-spezifisch

Ein Vergleich der Datensätze zeigte eine Überschneidung von 133 Transkripten, welche eine in der Tendenz vergleichbare Regulierung nach Infektion mit jedem der drei getesteten OPV aufweisen. Als größte funktionale Einheit konnte eine Gruppe von 46 Genen identifiziert werden, welche der Histon-Familie zugeordnet werden. Diese Histon-Gene wurden alle einheitlich durch eine VACV-, CPXV- oder MPXV-Infektion induziert. Eine Induktion von Histon-Genen ist ein bekanntes Artefakt bei *Microarray* Analysen von OPV-infizierten Zellen. Es beruht auf der unspezifischen *de novo* Polyadenylierung der generell nicht-polyadenylierten Histon-mRNAs durch die virale Poly(A)-Polymerase, was die Amplifikation und Detektion von Histon-mRNAs im *Microarray* stark begünstigt. Sämtliche hochregulierten Gene der Histon-Familie wurden daher als vermutete Artefakte von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Nach Ausschluss der Histon-Gene verblieben 87 Transkripte, welche tendenziell vergleichbar durch alle drei OPV reguliert wurden. Insgesamt zeigte sich für den Großteil der nach VACV- oder CPXV-Infektion induzierten oder reprimierten Transkripte eine Virus-spezifische Regulierung. So wurden z.B. nur ca. 29,2 % der CPXV-induzierten Gene auch nach VACV-Infektion hochreguliert, während insgesamt ca. 58,2 % der CPXV-induzierten Transkripte CPXV-spezifisch waren. Im Gegensatz dazu wurden ca. 73,8 % der MPXV-induzierten Transkripte auch nach CPXV-Infektion hochreguliert (s. Abb. 8).



**Abbildung 8: Überschneidungen der Genregulation nach Infektion.** Dargestellt ist die Anzahl der zellulären Transkripte, welche spezifisch durch VACV-, CPXV- oder MPXV-Infektion reguliert wurden, bzw. in der Tendenz vergleichbare Regulierung durch zwei oder alle drei OPV zeigten. Insgesamt zeigt sich eine mehrheitlich Virus-spezifische Regulierung zellulärer Transkripte mit wenigen Überschneidungen.

### 3.1.4 CPXV und MPXV beeinflussen die Expression Immun-assoziiierter Gene

Da die Regulierung zellulärer Gene überwiegend Virus-spezifisch erfolgte, sollte der unterschiedliche Einfluss einer VACV-, CPXV- oder MPXV-Infektion auf die Wirtszelle näher untersucht werden. Hierzu wurde die Funktion der regulierten zellulären Gene analysiert. Die Zuordnung dieser Gene zu definierten biologischen Prozessen erfolgte anhand eines Abgleichs mit der *Biological Process Ontology* Datenbank des *Gene Ontology* (GO) Projekts (Stand 06.02.2012). Anschließend wurden überrepräsentierte biologische Prozesse, wie unter 2.14.3 beschrieben, identifiziert.

Innerhalb der 87, durch VACV, CPXV und MPXV vergleichbar regulierten, Transkripte waren nur Gene signifikant überrepräsentiert ( $p = 1.1 \times 10^{-5}$ ), die an der Inaktivierung der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Aktivität beteiligt waren (definiert durch den GO Begriff GO:0000188). Im Folgenden wurde der Fokus aber auf die Mehrheit der Virus-spezifisch regulierten Gene gelegt. Ein signifikant überrepräsentierter Anteil der nach CPXV- oder MPXV-Infektion regulierten Gene ließ sich dabei immunbiologischen Prozessen zuordnen. Im Fall der CPXV-Infektion waren insbesondere viele Gene betroffen, welche an der Regulation der Migration von Leukozyten ( $p = 6,2 \times 10^{-8}$ ) und der Differenzierung myeloider Zellen ( $p = 6,5 \times 10^{-4}$ ) beteiligt sind. Innerhalb der VACV-regulierten Transkripte konnte keine Überrepräsentation immunbiologisch relevanter Prozesse gezeigt werden.

Ausgehend von diesen Daten wurden die durch Virusinfektion regulierten Gene bezüglich ihrer immunbiologischen Bedeutung näher charakterisiert. Hierzu wurde ein Abgleich mit der *Immune System Process Ontology* Datenbank des GO Projekts (Stand 06.02.2012) durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass zelluläre Gene, welche an der Regulation der Migration von Leukozyten ( $p = 6 \times 10^{-3}$ ) bzw. an der positiven Regulation der Leukozytenmigration ( $p = 1.2 \times 10^{-2}$ ) beteiligt sind, unter den von MPXV bzw. CPXV betroffenen Genen überrepräsentiert sind. Zudem konnte nach MPXV- bzw. CPXV-Infektion eine signifikante Überrepräsentation von regulierten Genen identifiziert werden, welche am TRIF-abhängigen Toll-like Rezeptor Signalweg ( $p = 5.9 \times 10^{-3}$ ) bzw. am Toll-like Rezeptor 2 Signalweg ( $p = 4.9 \times 10^{-2}$ ) beteiligt sind. Nach Infektion mit VACV konnte keine signifikant überrepräsentierte Regulation von immunbiologisch relevanten Genen beobachtet werden (siehe auch: Bourquain D., Dabrowski W., Nitsche A., 2012 (23)). Bei den Genen, welche an der Regulation der Migration von Leukozyten beteiligt sind, fiel insbesondere eine Induktion mehrerer Cytokin-Gene durch CPXV- und MPXV-Infektion auf.

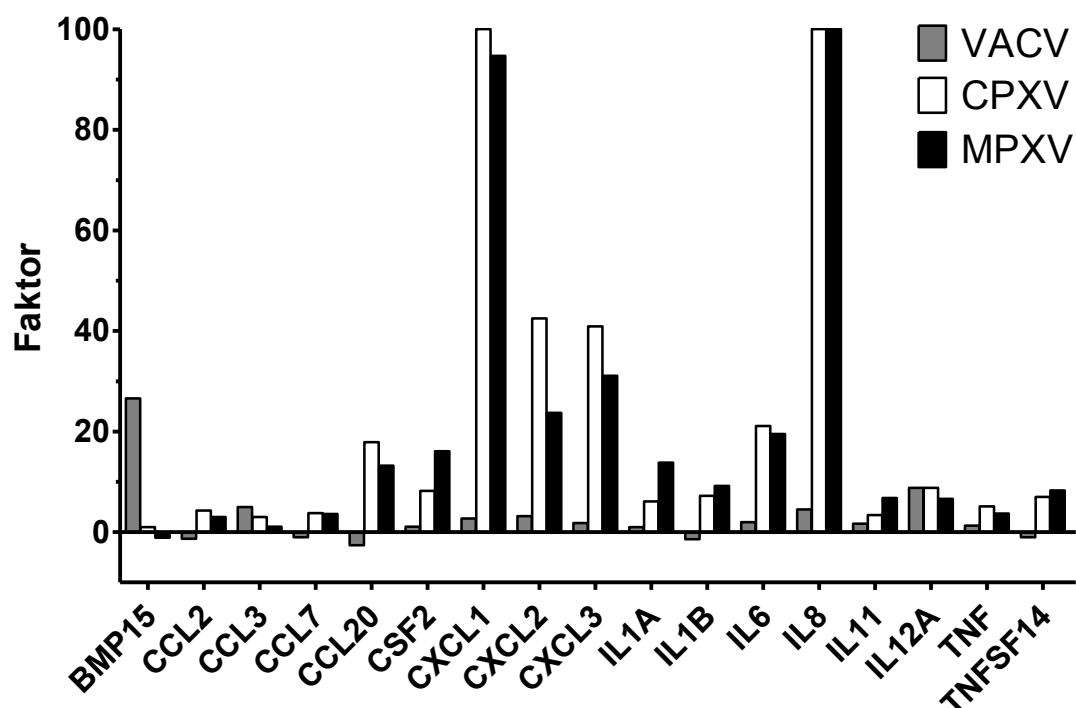
### 3.1.5 CPXV und MPXV induzieren Cytokin-Gene stärker als VACV

Die vorhergehenden Analysen hatten eine auffällige Hochregulierung vieler Cytokin-Gene nach Infektion durch CPXV und MPXV, nicht jedoch nach Infektion mit VACV gezeigt. Daher wurde eine detaillierte Analyse der Expression von Cytokin-Genen nach Infektion mit VACV, CPXV und MPXV durchgeführt. Die Auswahl erfolgte auf Basis des GO Begriffs „*cytokine activity*“ (GO:0005125, Stand 02.03.2012). In Abbildung 9 ist die Expression von Cytokin-Genen gezeigt, welche im Mittel eine mindestens zweifache Hoch- oder Herunterregulierung nach Infektion mit VACV, CPXV oder MPXV zeigten und deren Signalintensitäten signifikant ( $p < 0,01$ ) über dem Hintergrund lagen.

2.2	1.7	2.9	2.7	4.7	5	LIF
1.8	1.2	2.4	1.6	4	3.3	GDF15
1.7	1.4	2.8	2.8	1.4	5.8	LTB
1.7	0.6	6.7	2.6	2.4	8.2	CCL7
0.8	0.6	4.3	3.2	2.3	6.1	CCL2
1.3	1.9	2.7	3.5	8.8	6.3	IL11
1.4	0.9	16.3	3.9	9.6	20.3	CSF2
1.4	0.7	12.2	4.3	10.3	5.9	TNFSF14
1.6	1	7.5	6.5	3.7	24.8	IL1A
1	0.9	9.1	6.6	2.4	29.8	IL1B
0.7	2.5	3.6	15	1.8	34.5	CXCL3
4.7	5.3	12.2	9.2	17.7	8.3	LIF
4.7	3.8	10.7	7.7	11.4	6.2	AREG
5.3	3.6	6.9	4.7	6.2	2	CMTM7
2.8	2.8	27.4	23.5	16.4	63.1	CXCL2
2.4	1.7	24.8	16.3	11.8	41.5	IL6
1.9	2.1	50.7	37.3	16.9	82.4	CXCL3
1.5	0.2	116.3	7.5	4	26.2	CCL20
74.1	10.6	1.4	0.9	0.9	0.7	BMP15
5.8	4.8	4.2	2.7	1.1	0.7	CCL3
2.1	0.9	4.3	3.1	2.9	1.1	TSLP
1.4	1.5	1.9	1.4	1.5	1.9	TNF
0.9	0.9	2.6	2.2	1	0.7	EDN1
1.1	0.8	1.5	1	1	0.9	CMTM7
0.8	0.5	1.3	1	1.1	1.2	NRG1
0.8	0.5	1.3	1	1.1	1.2	NRG1
1.4	0.2	1.3	0.2	0.9	0.2	IL8
0.5	0.5	0.6	0.8	0.6	1.1	SPP1
0.4	0.4	0.4	0.3	0.5	0.6	TNFSF10
9.4	1.9	494.4	122.6	202.2	510.3	IL8
3	2.8	520.6	291.4	136	594.7	CXCL1
VACV	VACV	CPXV	CPXV	MPXV	MPXV	

**Abbildung 9: Differentielle Regulation von Cytokin-Genen.** Dargestellt sind die Ergebnisse beider Replikate der *Microarray*-Analysen VACV-, CPXV-, oder MPXV-infizierter Zellen. Angegeben ist der Faktor der Regulation im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Es konnte eine Induktion zahlreicher Cytokin-Gene nach CPXV- und MPXV-Infektion festgestellt werden, welche nicht nach VACV-Infektion auftritt. Sortierung der Gene nach Ähnlichkeit des Expressionsmusters. Rot = Hochregulation, grün = Herunterregulation. Bei mehrfach aufgeführten Genen erfolgte die Detektion über unterschiedliche Sonden.

Es konnte eine erhöhte Expression der Cytokin-Gene *CCL2*, *CCL7*, *CCL20*, *CSF2*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *IL8*, *IL11*, *TNF* und *TNFSF14* nach CPXV- oder MPXV-, nicht jedoch nach VACV-Infektion beobachtet werden. Im Gegensatz dazu, trat eine VACV spezifische Hochregulierung nur bei den Cytokinen *BMP15* und *CCL3* auf. Die Expression der Cytokin-Gene *NRG1* und *SPP1* schien nach einer VACV-Infektion leicht herunterreguliert zu werden, nicht aber, oder schwächer nach Infektion mit CPXV und MPXV. Insgesamt zeigte sich nach Infektion mit CPXV oder MPXV, nicht jedoch nach Infektion mit VACV eine Induktion zahlreicher pro-inflammatorischer Cytokine. Die aus den *Microarray*-Versuchen errechnete Regulierung dieser Gene ist in Abbildung 10 als Fehler-gewichteter Durchschnittswert dargestellt.

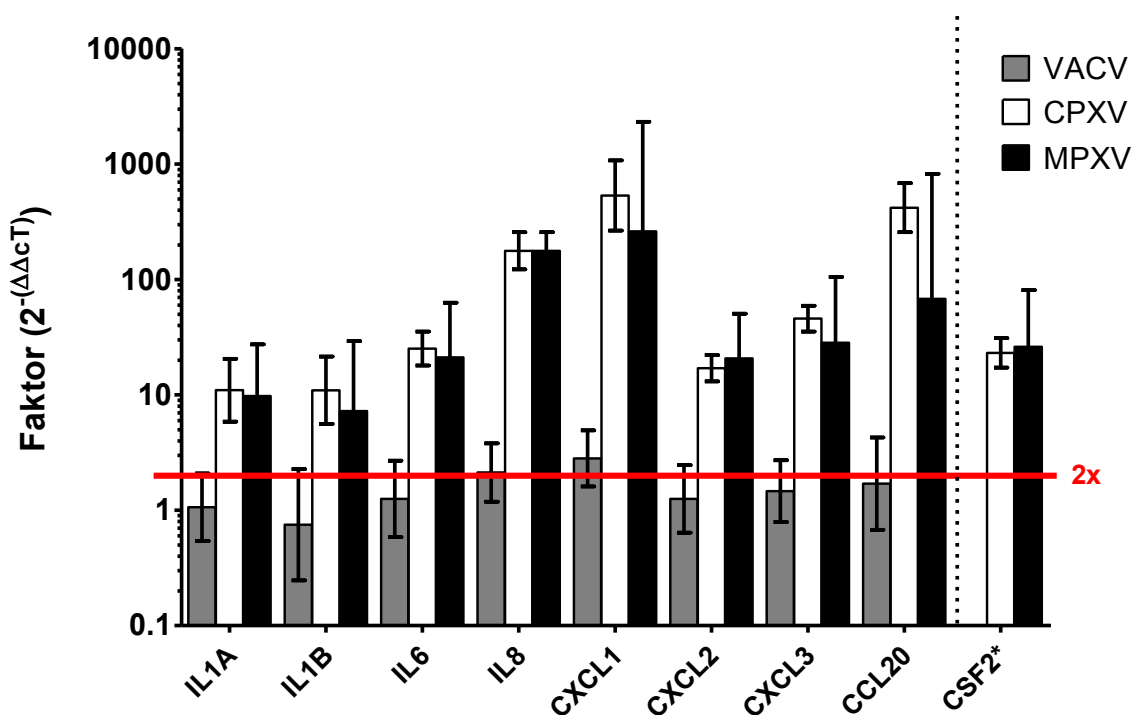


**Abbildung 10: Differentielle Hoch- oder Herunterregulierung von Cytokin-Genen nach Infektion von HeLa Zellen mit VACV, CPXV oder MPXV.** Die Faktoren geben die Veränderung der Genexpression im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen in der *Microarray*-Analyse wieder. Dargestellt ist der, aus beiden *Microarray*-Experimenten über eine Fehler-gewichtete Durchschnittsberechnung kombinierte Faktor der Genregulation. Insbesondere die Gene *IL8* und *CXCL1* wurden stark durch CPXV und MPXV, nicht jedoch durch VACV induziert.

### 3.2 Verifizierung der *Microarray*-Ergebnisse mittels TaqMan® qPCR

Zur Verifizierung der Ergebnisse der *Microarray*-Analysen wurde die Expression ausgewählter Cytokin-Gene in infizierten HeLa Zellen mittels TaqMan® qPCR analysiert. Hierzu wurde cDNA aus drei unabhängigen biologischen Proben (6 h p.i.) verwendet. Nach Normalisierung anhand der Werte der *MYC*-(c-Myc)-qPCR ( $\Delta C_T$ ) wurde der Unterschied der

Genexpression zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (2.13.9) errechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Wie zuvor in den *Microarray*-Analysen zeigte sich eine Induktion zahlreicher Cytokine-Gene, insbesondere *IL8*, *CXCL1* und *CCL20*, nach Infektion mit CPXV und MPXV, nicht jedoch nach Infektion mit VACV. Eine im Mittel mehr als zweifache Hochregulierung konnte nach VACV-Infektion lediglich für die Expression von *IL8* (2,1-fach) und *CXCL1* (2,8-fach) ermittelt werden. Nach Infektion mit CPXV und MPXV wurden beide Cytokine im Vergleich zur Kontrolle jedoch mehr als 100-fach hochreguliert. Eine Expression von *CSF2* mRNA konnte ausschließlich in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Expression in VACV-infizierten Zellen wurde daher in diesem Fall als Referenz zur Berechnung des  $\Delta\Delta\text{Ct}$  Werts verwendet. Im Vergleich zu VACV-infizierten Zellen war die *CSF2* Expression in CPXV-infizierten Zellen 23,1-fach und in MPXV-infizierten Zellen 26,1-fach höher. Insgesamt konnte in der qPCR die zuvor in der *Microarray*-Analyse identifizierte Induktion bestimmter Cytokin-Gene, insbesondere von *CXCL1*, -2 und -3, *IL6*, *IL8* und *CCL20* durch CPXV- oder MPXV-Infektion verifiziert werden. Gleichsam konnte das Fehlen einer solchen Induktion nach Infektion mit VACV bestätigt werden.

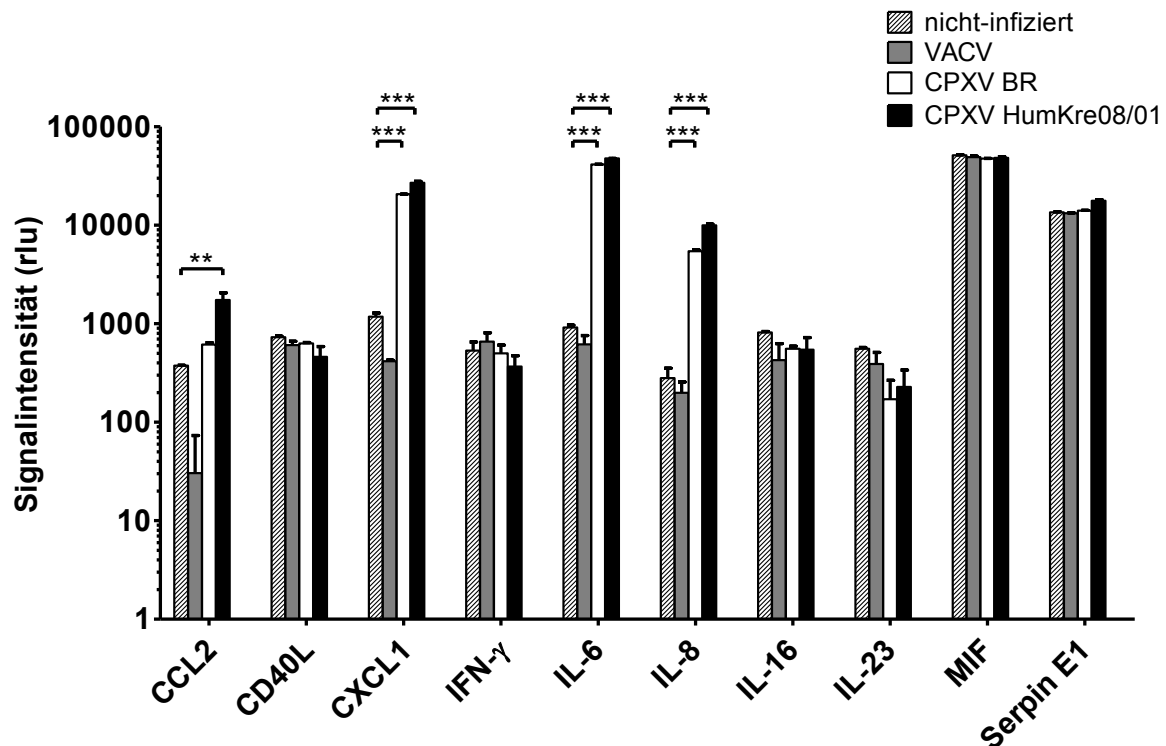


**Abbildung 11: Verifizierung der Ergebnisse der *Microarray*-Analyse in der qPCR.** Dargestellt ist die Expression ausgewählter Cytokin-Gene in infizierten im Vergleich zu nicht-infizierten HeLa Zellen. Normalisierung auf *MYC* Genexpression und Berechnung anhand der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Die rote Linie markiert den Bereich zweifacher Hochregulierung. Eine deutliche Induktion konnte nach CPXV- oder MPXV-, nicht jedoch nach VACV-Infektion gezeigt werden. \*Da keine *CSF2* Expression in nicht-infizierten Zellen detektiert wurde, beziehen sich die Faktoren auf die *CSF2* Expression in VACV-infizierten Zellen.

### 3.3 Detektion sekretierter Cytokine nach CPXV- und VACV-Infektion

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die erhöhte mRNA-Expression bestimmter Cytokin-Gene auch in einer verstärkten Sekretion dieser Cytokine resultiert. Hierzu erfolgte eine relative Quantifizierung der Menge verschiedener Cytokine im Zellkulturüberstand. Es wurden zellfreie Zellkulturüberstände von nicht-infizierten und CPXV-, oder VACV-infizierten HeLa Zellen verwendet. Erneut wurde ein Zeitpunkt von 6 h p.i. für die Analyse bestimmt. Da die vorherigen Ergebnisse eine vergleichbare Cytokin-Induktion durch CPXV- und MPXV-Infektionen zeigten (s. 3.2) und das Arbeiten mit MPXV sicherheitstechnischen Einschränkungen unterliegt, wurde anstelle von MPXV ein weiterer CPXV Stamm in die Messung aufgenommen. Die Detektion erfolgte mit dem *Proteome Profiler® Human Cytokine Array Panel A*, wie unter 2.20.1 beschrieben. Um einen Vergleich der Cytokin-Mengen in den einzelnen Proben zu ermöglichen, wurden die Einzelwerte anhand der Werte der jeweiligen Positivkontrollen normalisiert. In Abbildung 12 ist die relative Cytokin-Konzentration im Überstand für die am stärksten sezernierten Cytokine vergleichend dargestellt (vollständige Daten im Anhang).

Unabhängig von der Infektion wurden der *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) und der Serinprotease-Inhibitor Serpin E1 in allen Proben stark sekretiert. Nach Infektion mit beiden CPXV Stämmen war ebenfalls eine starke Sekretion von IL-6, IL-8 und CXCL1 (GRO- $\alpha$ ) zu beobachten. Die Sekretion dieser Cytokine durch nicht-infizierte oder VACV-infizierte Zellen erfolgte hingegen deutlich schwächer. Einheitliche Effekte einer OPV-Infektion auf das Profil der Cytokin-Sekretion ließen sich nicht feststellen. Neben der Induktion mehrerer Cytokine durch eine CPXV-Infektion war auch die verminderte Sekretion verschiedener Cytokine nach VACV-Infektion auffällig. Im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen konnte insbesondere eine verminderte Sekretion von IL-2, IL-5, I-TAC (CXCL11), sTREM-1, CSF2 (GM-CSF) und CCL2 (MCP-1) nach VACV-Infektion festgestellt werden (s. Abb. 35, Anhang). Mit Ausnahme von CCL2 zeigten diese Cytokine jedoch insgesamt nur schwache Signalintensitäten. Das Cytokin-Profil nach Infektion mit beiden CPXV Stämmen war nahezu einheitlich. Deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten CPXV Stämmen zeigten sich nur bei der Sekretion von IL-32 $\alpha$  und IL-17E, die beide nach Infektion mit CPXV HumKre08/01 stärker sekretiert wurden, als nach Infektion mit CPXV BR (s. Anhang). In beiden Fällen waren die Signalintensitäten jedoch insgesamt nur gering. Zusammenfassend konnte eine starke Induktion der Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine nach CPXV-Infektion insbesondere im Fall von IL-6, IL-8 und CXCL1 beobachtet werden.

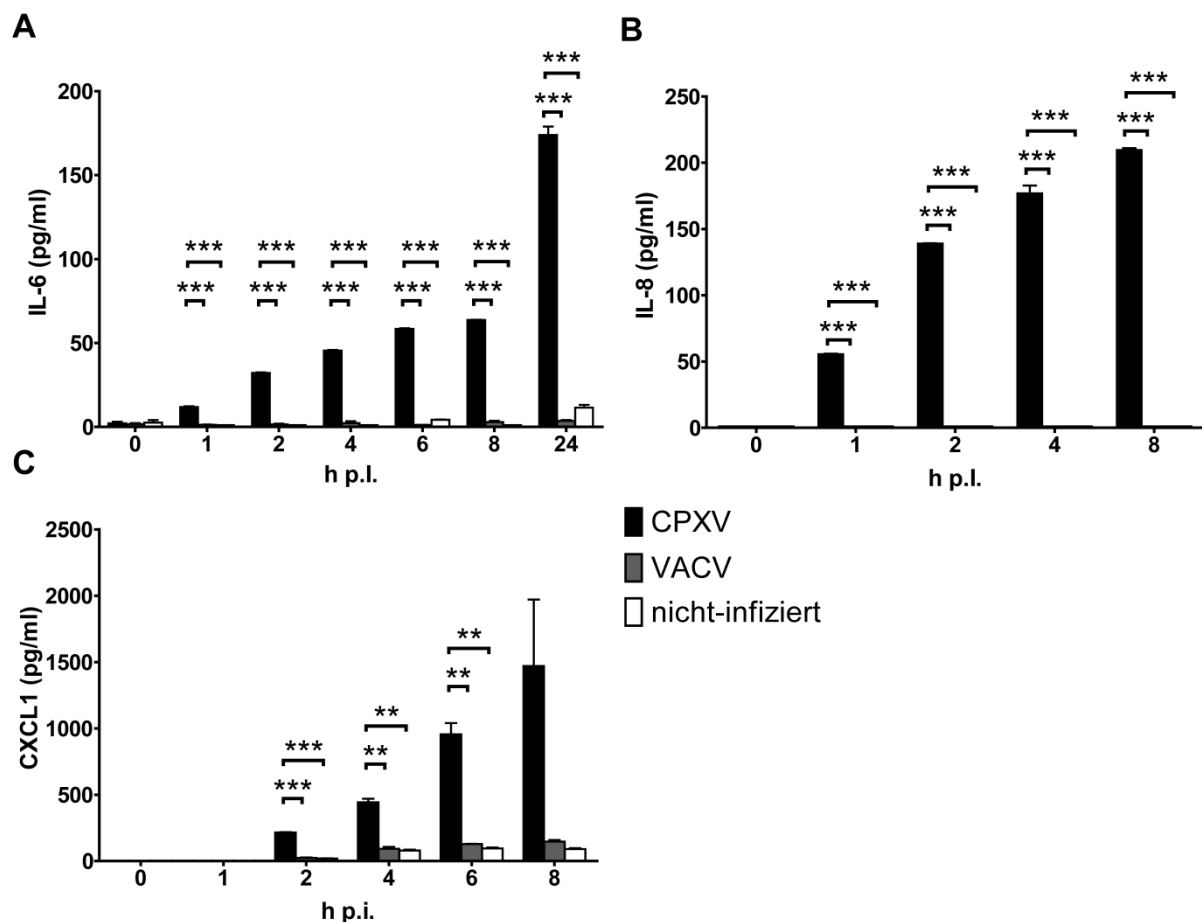


**Abbildung 12: Relative Quantifizierung der Cytokin-Konzentrationen im Überstand von VACV-, CPXV BR-, CPXV HumKre08/01-, oder nicht-infizierten Zellen (jeweils 6 h p.i.).** Zum Vergleich der Datensätze wurden die gemessenen Signalintensitäten auf die Werte der jeweiligen Positivkontrollen normalisiert. Insbesondere CXCL1, IL-6 und IL-8 werden stark nach CPXV BR- und HumKre08/01-, nicht jedoch nach VACV-Infektion sekretiert. Statistik: *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Test*, rlu = *relative luminescence units*.

### 3.4 Kinetik der Sekretion von IL-6, IL-8 und CXCL1

Im Folgenden wurde eine absolute Quantifizierung der sezernierten Cytokin-Mengen im zeitlichen Verlauf der Infektion durchgeführt, um Zeitpunkt-abhängige Unterschiede ausschließen zu können. Hierzu wurde die Konzentrationen von IL-6, IL-8 und CXCL1 im Zellkulturüberstand zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion mit VACV oder CPXV mittels ELISA gemessen (s. 2.20.2). Die gemessenen Cytokin-Konzentrationen im Zellkulturüberstand sind in Abbildung 13 dargestellt. Zum Zeitpunkt der Infektion (0 h) waren die untersuchten Cytokine nicht oder nur in äußerst geringen Konzentrationen ( $< 5$  pg/ml) nachweisbar. Bereits 1 h nach Infektion mit CPXV waren erhöhte Konzentrationen an IL-6 und IL-8 messbar. Nach 2 h wurde ebenfalls ein Anstieg der CXCL1 Konzentration im Zellkulturüberstand CPXV-infizierter Zellen gemessen. Die IL-6 Konzentration stieg im weiteren Verlauf der CPXV-Infektion auf bis zu  $174 \pm 7$  pg/ml an (24 h p.i.). Ähnlich verhielt sich die Konzentration an IL-8, die nach CPXV-Infektion kontinuierlich anstieg und bis zu  $210 \pm 2$  pg/ml (8 h p.i.) erreichte. Hingegen blieben die IL-6 bzw. IL-8 Konzentrationen nach VACV-Infektion oder ohne Infektion durchgehend gering ( $< 15$  pg/ml) bzw. unterhalb des

detektierbaren Bereichs. Die CXCL1-Konzentration zeigte sowohl nach CPXV, als auch nach VACV-Infektion oder ohne Infektion einen deutlichen Anstieg innerhalb des Messzeitraums. Nach CPXV-Infektion war die CXCL1-Sekretion jedoch zu allen Zeitpunkten deutlich stärker. Nach 6 h erreichte die CXCL1-Konzentration im Überstand CPXV-infizierter Zellen  $956 \pm 119$  pg/ml im Vergleich zu  $95 \pm 10$  pg/ml ohne Infektion und  $128 \pm 2$  pg/ml nach VACV-Infektion. Zusammenfassend konnte eine starke Induktion der Sekretion der Cytokine IL-6, IL-8 und CXCL1 nach CPXV-Infektion belegt werden, welche nicht, oder im Fall von CXCL1, schwächer nach Infektion mit VACV oder *Mock*-Infektion auftrat.



**Abbildung 13: Absolute Quantifizierung der Sekretion von IL-6, IL-8 und CXCL1 im Infektionsverlauf.** Die Cytokin-Konzentrationen wurden mittels spezifischer ELISAs bestimmt. Es wurde Zellkulturüberstand von VACV-, CPXV- oder nicht-infizierten HeLa Zellen verglichen. Lediglich nach CPXV-Infektion zeigt sich eine starke Sekretion von IL-6, IL-8 und CXCL1, welche über die Zeit zunimmt. Statistik: *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Test*.

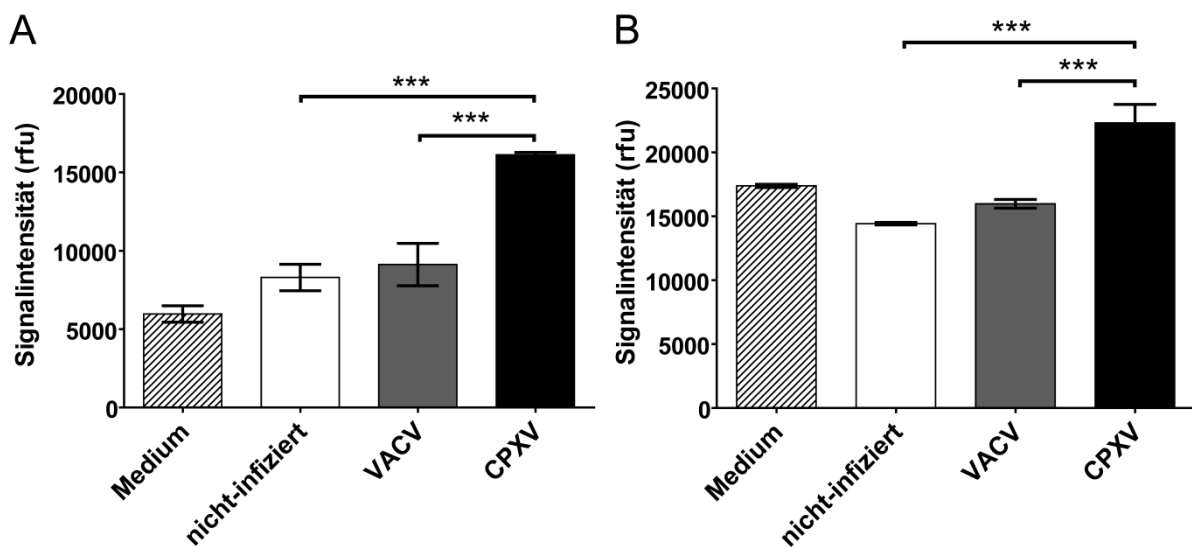
### 3.5 CPXV induziert die Rekrutierung von Makrophagen und Monozyten *in vitro*

Um die Auswirkungen der verstärkten Cytokin-Sekretion zu untersuchen, sollte im Folgenden die Rekrutierung von Leukozyten durch Überstände CPXV-infizierter Zellen im Chemotaxis Test analysiert werden. Zuvor konnte eine verstärkte Sekretion der Chemokine IL-8 und



CXCL1 und des chemotaktisch wirksamen Cytokins IL-6 in Folge einer CPXV-Infektion aufgezeigt werden. Als Modellsystem für Monozyten wurde die humane, monozytäre Zelllinie U937 verwendet. Weiterhin wurden U937 Zellen durch Inkubation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) zu einem Makrophagen-ähnlichen Phänotyp ausdifferenziert (U937+PMA). Zudem wurde die humane Zelllinie HL-60, welche überwiegend den Phänotyp neutrophiler Promyelozyten abbildet, als Modellsystem für neutrophile Granulozyten verwendet.

Die chemotaktische Aktivität von Zellkulturüberständen VACV-, CPXV- oder nicht-infizierter HeLa Zellen (24 h p.i., MOI = 1) gegenüber diesen Zelllinien wurde mit dem *QCM Chemotaxis Cell Migration Assay* (Millipore) untersucht (s. 2.17.8). Als Kontroll-Stimulanz wurde frisches Zellkulturmedium verwendet. Die Auswertung erfolgte nach 16 h Inkubation. Wie in Abbildung 14 gezeigt, war eine signifikant stärkere Rekrutierung von U937 (A) und U937+PMA (B) Zellen durch Zellkulturüberstände CPXV-infizierter Zellen zu beobachten. Überstände VACV- oder nicht-infizierter Zellen induzierten eine vergleichbar geringe Migration dieser Zellen, die keine signifikante Unterscheidung zur chemotaktischen Aktivität frischen Zellkulturmediums aufwies. Im Fall von HL-60 Zellen konnte keine deutliche Stimulation der Zellmigration durch die Zellkulturüberstände infizierter Zellen erzielt werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur chemotaktischen Aktivität der Überstände nicht-infizierter Zellen oder frischen Mediums (Daten nicht gezeigt).



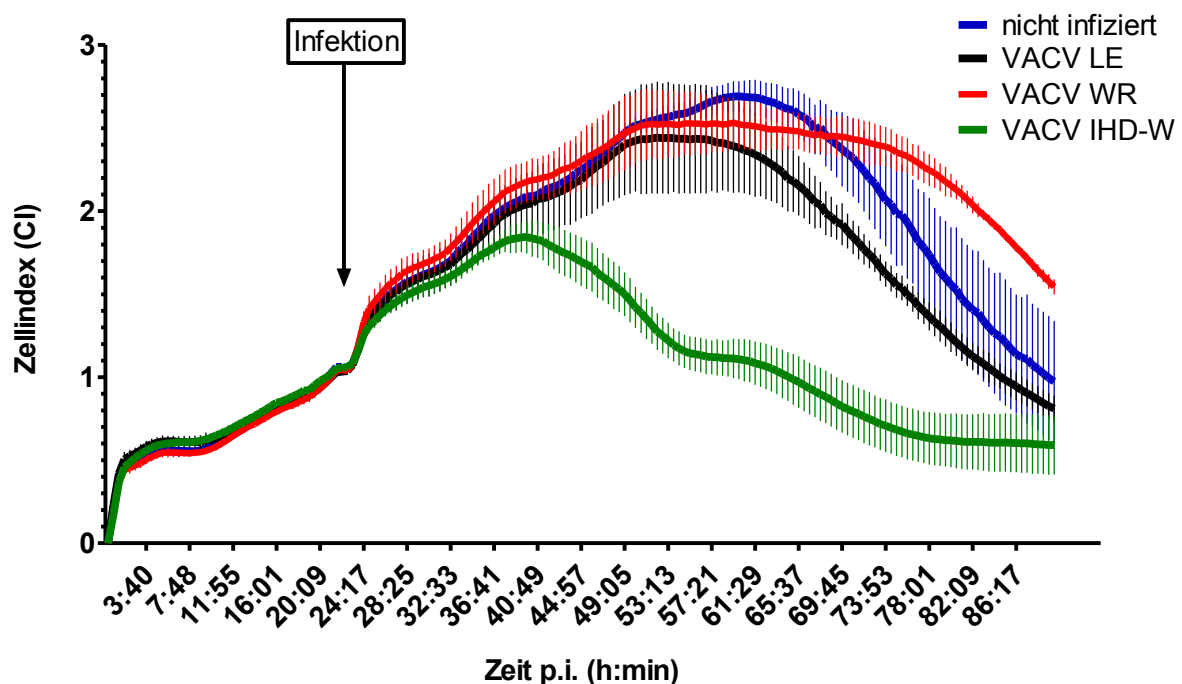
**Abbildung 14: Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen durch Zellkulturüberstände infizierter Zellen.** Die Migration von monozytären U937 Zellen (A) und Makrophagen-artigen U937+PMA Zellen (B) hin zu Überständen VACV-, CPXV- oder nicht-infizierter Zellen bzw. zu frischem Zellkulturmedium wurde im Chemotaxis Test bestimmt. Dargestellt ist die Signalintensität in *relative fluorescence units* (rfu). Es konnte eine signifikant stärkere Rekrutierung beider Zelltypen durch Überstände CPXV-infizierter Zellen gezeigt werden. Statistik: *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Test*.

### 3.6 Analyse der Replikationsfähigkeit von OPV in Makrophagen

Im Gegensatz zur VACV-Infektion konnte nach CPXV-Infektion *in vitro* eine verstärkte Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen gezeigt werden. Daher wurde im Folgenden die Fähigkeit von CPXV und VACV zur produktiven Replikation in diesen Zelltypen untersucht. Hierbei sollte insbesondere die Bedeutung des *host range* Proteins p28 untersucht werden. Während p28 von allen bisher untersuchten CPXV kodiert wird, findet sich bei VACV ausschließlich beim VACV Stamm IHD-W ein vollständiges p28 Gen.

#### 3.6.1 Vergleich des CPEs verschiedener VACV Stämme in Makrophagen

Um die Bedeutung von p28 für die Replikation von OPV in Makrophagen weiter zu untersuchen, wurde zuerst die Replikation von VACV IHD-W im Vergleich zu anderen VACV Stämmen analysiert. Als Modellsystem für Makrophagen diente die murine Zelllinie J774A.1. Zur Bestimmung der Replikationsfähigkeit von VACV in dieser Zelllinie wurde der Zellstatus infizierter Zellen in Echtzeit mittels des *xCelligence* Systems (Roche) überwacht (s. 2.17.9). Als Maß für Veränderungen des Zellstatus dient der Zellindex (CI), welcher Veränderungen der gemessenen elektrischen Impedanz wiedergibt. In Abbildung 15 ist der Verlauf des CIs für nicht-infizierte und VACV-infizierte J774A.1 Zellen dargestellt.



**Abbildung 15: Echtzeit-Analyse von J774A.1 Zellen nach Infektion mit verschiedenen VACV Stämmen.** Die Replikation der p28-negativen VACV Stämme VACV WR und LE und des p28-positiven Stammes VACV IHD-W wurde anhand des Zellindex (CI) als Maß für den cytopathischen Effekt untersucht. Die Datensätze wurden auf den Zeitpunkt der Infektion normalisiert. Lediglich nach Infektion mit VACV IHD-W sind Anzeichen eines cytopathischen Effekts zu erkennen.

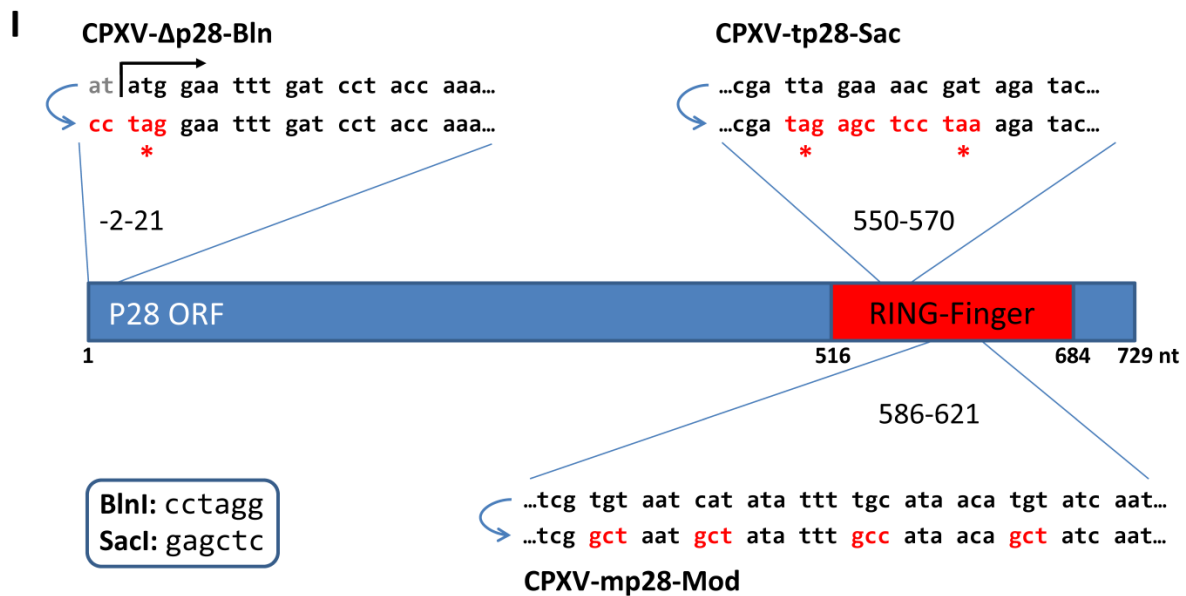
In den ersten 24 h nach Aussaat der Zellen war durchgängig ein Anstieg des CIs zu beobachten, der auch nach Infektion weiter andauerte. Bei VACV IHD-W infizierten Zellen nahm der CI jedoch ca. 20 h p.i. (ca. 40 h nach Aussaat der Zellen) stark ab, während er bei VACV Lister/Elstree (LE) und Western Reserve (WR) bzw. bei nicht-infizierten Zellen ein Plateau erreichte. Demzufolge löste lediglich der p28-exprimierende VACV Stamm IHD-W in der Makrophagen-Zelllinie J774A.1 einen cytopathischen Effekt aus.

### 3.6.2 Konstruktion von CPXV mit mutiertem p28 Gen

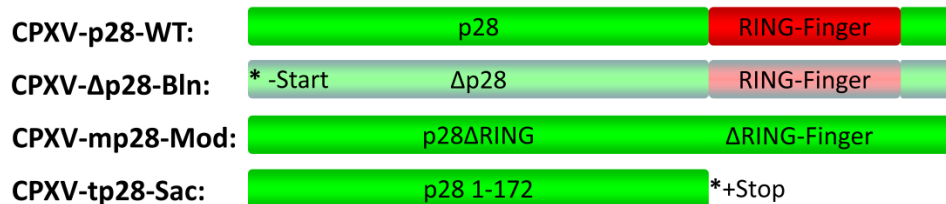
Im Folgenden sollte die Bedeutung des p28 Proteins für die Replikationsfähigkeit von CPXV in Makrophagen untersucht werden. Hierzu wurden Virusmutanten erstellt, welche einen *Knockout*, eine Trunkierung oder eine Modifikation des p28 Gens tragen. Die Konstruktion von mutierten CPXV erfolgte über gerichtete Mutagenese eines CPXV BR Genoms, welches in Form eines artifiziellen bakteriellen Chromosoms (*bacterial artificial chromosome*, BAC) vorlag, wie unter 2.15 beschrieben. Zusätzlich zu den gewünschten Punktmutationen wurden Restriktionsschnittstellen zur späteren Identifizierung der Mutanten in das p28 Gen eingebracht (s. auch Abb. 5). Die Integrität der mutierten BACs, sowie die erfolgreiche Mutagenese wurden, wie unter 2.15.2 beschrieben, über Kolonie-PCR, Restriktionsfragmentlängenanalyse und Sequenzierung verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Es wurden drei verschiedene mutierte Varianten des p28 Gens erstellt (s. Abb. 16). Zum einen wurde die Expression des p28 Gens durch eine *Knockout* Mutation des Startcodons unterbunden (CPXV- $\Delta$ p28-Bln). Weiterhin wurde eine trunkierte Variante des p28 ORFs durch Insertion dreier Stopcodons anstelle der Codons für die Aminosäuren 185, 188 und 194 erstellt (CPXV-tp28-Sac). Diese Variante spiegelt die Länge des trunkierten p28 Proteins von VACV WR wider. Die RING-Finger Domäne ist hierbei vollständig deletiert. Bei der dritten Mutante wurden vier Aminosäuresubstitutionen eingeführt, um die Struktur der RING-Finger Domäne zu zerstören (CPXV-mp28-Mod). Die Cysteine an den Aminosäurepositionen 197, 202 und 205 und ein Histidin an Position 199 wurden hierzu gegen Alanin ausgetauscht. Ausgehend von den mutierten CPXV-BACs wurden Rückmutanten (Revertanten) konstruiert (CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR, CPXV-p28<sup>+</sup>-SacR, CPXV-p28<sup>+</sup>-ModR). Hierzu wurden die eingeführten Mutationen, wie zuvor beschrieben, in den Wildtyp-(WT-)Zustand zurückmutiert.

Die Rekonstitution infektiöser Viren erfolgte durch Transfektion der erzeugten BAC-Plasmide in Vero Zellen und Infektion mit einem nicht-replikationsfähigen Helfervirus, wie unter 2.15.5 beschrieben. Alle erzeugten Viren kodieren zudem das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des späten FPXV Promotors p4B.



## II



**Abbildung 16: Mutation des p28 Proteins.** I – Mutationen des CPXV BR p28 ORFs auf Nukleinsäure-Ebene. Die obere Spalte zeigt die Wildtyp-Sequenz, die untere die mutierte Sequenz. Mutationen der Sequenz sind rot hervorgehoben. BlnI bzw. SacI = BlnI- bzw. SacI-Restriktionsschnittstelle. II – Resultierende Veränderungen der mutierten p28 Proteine. \* = eingefügtes Stopcodon.

Das Genom aller konstruierten Viren wurde sequenziert und der Genotyp des p28 Gens, sowie die Integrität des Genoms und die Abwesenheit weiterer Mutationen verifiziert (Daten nicht gezeigt). Alle erzeugten Viren sind in Tabelle 21 aufgeführt.

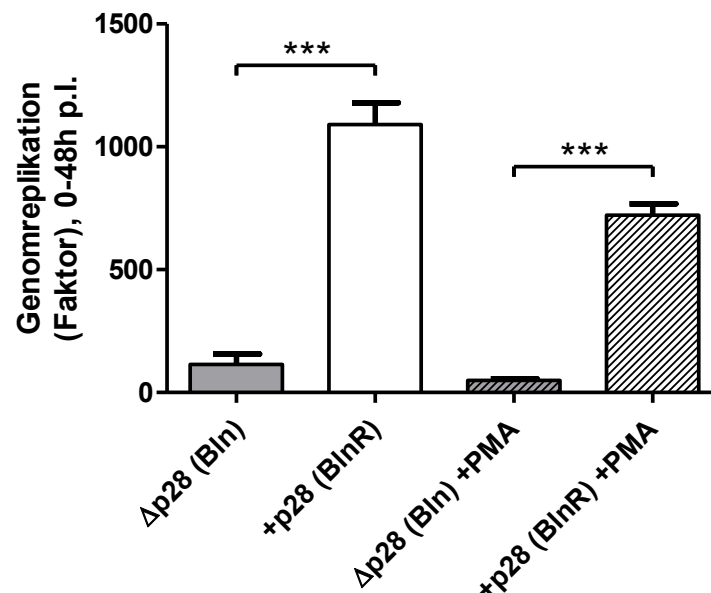
**Tabelle 21: Konstruierte rekombinante Viren**

Virus	Beschreibung	Ursprung
CPXV-Δp28-Bln	p28 <i>knockout</i>	Mutation des Startcodons im CPXV BR BAC
CPXV-p28 <sup>+</sup> -BlnR	WT p28	Rückmutation des CPXV-Δp28-Bln BACs
CPXV-tp28-Sac	Trunkiertes p28	Insertion eines Stopcodons im CPXV BR BAC
CPXV-p28 <sup>+</sup> -SacR	WT p28	Rückmutation des CPXV-tp28-Sac BACs
CPXV-mp28-Mod	Modifiziertes p28, RING-Finger Domäne zerstört	Codon-Mutagenese im CPXV BR BAC
CPXV-p28 <sup>+</sup> -ModR	WT p28	Rückmutation des CPXV-mp28-Mod BACs
CPXV-BAC-WT	WT p28	aus CPXV BR BAC

### 3.6.3 *In vitro* Charakterisierung der Replikationseffizienz der $\Delta p28$ -CPXV

Die Replikationseffizienz der p28-mutierten CPXV wurde *in vitro* auf verschiedenen Zelllinien analysiert. Laut Literatur wird p28 für die Replikation (von ECTV) *in vitro* nicht benötigt, mit der Ausnahme von primären peritonealen Makrophagen (183). Daher sollte die Bedeutung von p28 für die Replikation von CPXV in etablierten Zelllinien unterschiedlichen Spezies- und Gewebe-Ursprungs untersucht werden. Insbesondere sollte getestet werden, ob p28 für die Replikation in Monozyten- oder Makrophagen-artigen Zelllinien essentiell ist. Dazu wurde die Replikationseffizienz der  $\Delta p28$ -CPXV Mutante (CPXV- $\Delta p28$ -Bln) und der Revertante (CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR) im Vergleich zu Wildtyp-CPXV (CPXV-BAC-WT) ermittelt. Als Maß für die Replikationseffizienz diente die Vermehrung viraler Genomkopien innerhalb von 48 h p.i. (MOI = 0,1). Hierzu wurde die Anzahl intrazellulärer Virusgenome mittels qPCR unmittelbar nach der Infektion (0 h p.i.) und 48 h p.i. gemessen. Die Replikationseffizienz der Mutante im Vergleich zur Revertante wurde anhand der  $\Delta\Delta C_T$  Methode ermittelt (s. 2.13.9).

Bei verschiedenen Monozyten- bzw. Makrophagen-Zelllinien war eine eingeschränkte Genomreplikation der CPXV- $\Delta p28$ -Bln Mutante zu beobachten. Insbesondere nach Infektion von J774A.1 Zellen mit der CPXV- $\Delta p28$ -Bln Mutante zeigte sich eine signifikant geringere Genomreplikation im Vergleich zur Revertante (Abbildung 17). Der Effekt trat bei Infektion PMA-induzierter J774A.1 Zellen in vergleichbarer Form auf.



**Abbildung 17: Genomreplikation von CPXV- $\Delta p28$ -Bln in J774A.1 Zellen.** Dargestellt ist die Vermehrung viraler Genomkopien von CPXV- $\Delta p28$ -Bln im Vergleich zur Revertante CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR in J774A.1 Zellen oder PMA-induzierten J774A.1 Zellen innerhalb von 48 h nach Infektion. Die Mutante zeigte in beiden Zelltypen eine verringerte Genomreplikation im Vergleich zur Revertante. Normalisierung auf MYC Genkopien. Statistik: *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Test*.

In der Monozyten-Zelllinie THP-1 und der Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 zeigte sich ebenfalls eine eingeschränkte Replikation der  $\Delta p28$  Mutante. Im Vergleich zu J774A.1 Zellen waren diese Effekte allerdings nur schwach ausgeprägt (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Auf allen, nicht der Monozyten-/Makrophagen-Linie zugehörigen, Zelllinien diversen Spezies- oder Gewebe-Ursprungs waren die Replikationseffizienz von CPXV- $\Delta p28$ -Bln und der Revertante CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR bzw. des Wildtyp-Virus vergleichbar ( $\leq 1,23$ -fach geringere Genomreplikation, Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 22: Vergleich der Replikationseffizienz von CPXV- $\Delta p28$ -Bln *in vitro***

	Zelllinie	Spezies	Zelltyp	Replikation CPXV- $\Delta p28$ -Bln <sup>a</sup>
	HEK293T	<i>H. sapiens</i>	Epithelzellen (Niere)	
	HeLa	<i>H. sapiens</i>	Epithelzellen (Zervix)	
	Vero	<i>Chlorocebus sp.</i>	Fibroblasten-artig (Niere)	
	Rat2	<i>R. norvegicus</i>	Fibroblasten (embryonal)	
Leukozyten	THP-1	<i>H. sapiens</i>	Monozyten, leukämisch	$p < 0,001^b$
	THP-1 +PMA	<i>H. sapiens</i>	Makrophagen-artig	
	NR8383	<i>R. norvegicus</i>	Makrophagen (alveolar)	
	RAW264.7	<i>M. musculus</i>	Makrophagen (Aszites)	$p < 0,05$
	J774A.1	<i>M. musculus</i>	Monozyten/Makrophagen	$p < 0,0001$
	J774A.1 +PMA	<i>M. musculus</i>	Makrophagen	$p < 0,0001$

<sup>a</sup>Vervielfältigung viraler Genomkopien von CPXV- $\Delta p28$ -Bln im Vergleich zu CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR.

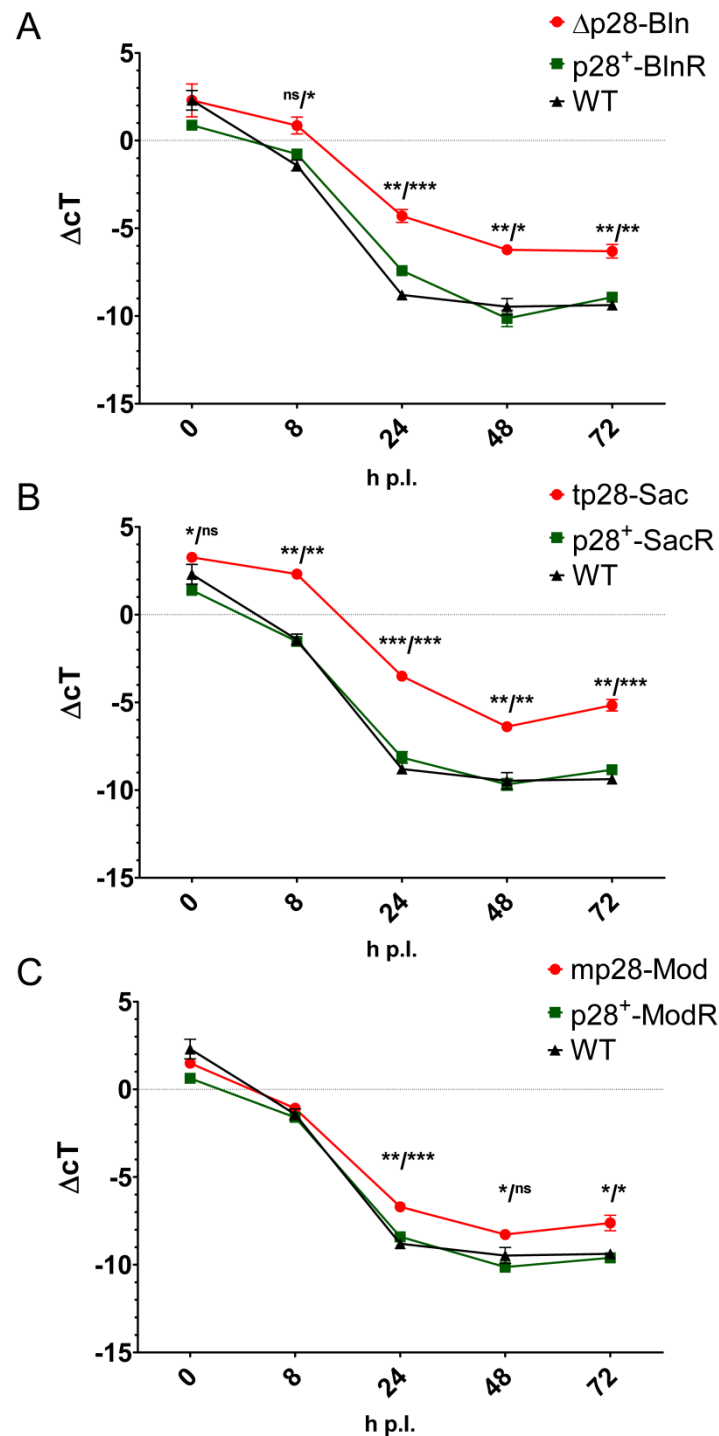
Grün = permissiv, rot = replikationsdefizient, gelb = schwach replikationsdefizient oder Daten nicht eindeutig. Statistik: t-Test (ungepaart, 2-seitig)

<sup>b</sup>nicht signifikant im Vergleich zu CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR, aber im Vergleich zu CPXV-BAC-WT

### 3.6.4 Kinetik der Genomreplikation p28-mutierter CPXV in J774A.1 Zellen

Die Bedeutung von p28 für die Replikation von CPXV in der Monozyten/Makrophagen Zelllinie J774A.1 sollte weiter charakterisiert werden. Hierzu sollte neben der Replikation der p28-*knockout* Mutante CPXV- $\Delta p28$ -Bln, auch die Replikation der CPXV Mutante mit trunkiertem p28 (CPXV-tp28-Sac) und der Mutante mit mutierter RING-Finger-Domäne (CPXV-mp28-Mod) mit den jeweiligen Revertanten und dem Wildtyp Virus (CPXV-BAC-WT) verglichen werden. Zur Ermittlung der Genomreplikation wurde die Menge intrazellulärer viraler Genomkopien zum Zeitpunkt der Infektion (0 h p.i.), sowie 8 h, 24 h, 48 h und 72 h p.i. mittels qPCR ermittelt (MOI = 0,1). Bereits 8 h nach Infektion mit CPXV- $\Delta p28$ -Bln wurden eine signifikant niedrigere Menge viraler Genomkopien (angegeben als  $\Delta cT(\text{Virusgenom} / \text{MYC})$ ) im Vergleich zu Revertante und Wildtyp-Virus gemessen. Obwohl auch nach Infektion mit der Mutante eine Vermehrung des Virusgenoms festgestellt wurde, war die Kopienzahl auch zu allen weiteren Zeitpunkten signifikant geringer (Abb. 18A). Nach Infektion mit CPXV-tp28-Sac zeigte sich ein vergleichbarer Infektionsverlauf, mit einer früh

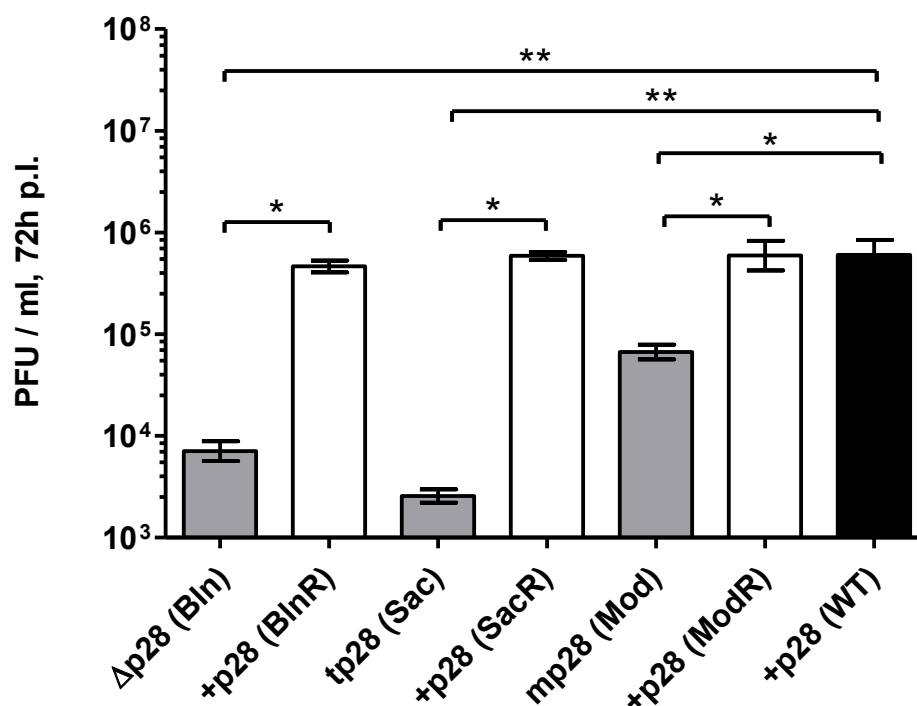
auf tretenden, signifikant schwächeren Genomreplikation (Abb. 18B). Eine ebenfalls weniger effiziente Vermehrung viraler Genomkopien zeigte sich auch im Fall der CPXV-Mutante CPXV-mp28-Mod (Abb. 18C). Die Attenuierung im Vergleich zu Revertante und Wildtyp-Virus war jedoch weniger ausgeprägt. In allen Fällen war die Vervielfältigung des Virusgenoms bei Revertanten und Wildtyp-Viren vergleichbar.



**Abbildung 18: Genomreplikation von CPXV- $\Delta$ p28-Bln (A), CPXV-tp28-Sac (B) oder CPXV-mp28-Mod (C) in J774A.1 Zellen.** Dargestellt im Vergleich zur Revertante und zum Wildtyp-Virus. Alle Mutanten zeigen eine eingeschränkte Genomreplikation im Vergleich zu Revertante und Wildtyp. Statistik: *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Test* (Revertante/WT), ns = nicht signifikant.

### 3.6.5 Die Produktion neuer Viruspartikel in J774A.1 Zellen ist p28-abhängig

Zur Verifizierung des p28-abhängigen Replikationsdefekts in J774A.1 Zellen, welcher auf Ebene der viralen Genomreplikation beobachtet wurde, sollte die Produktion von Nachkommen-Viren quantifiziert werden. Hierzu wurden die Anzahl infektiöser Partikel im Überstand infizierter J774A.1 Zellen unmittelbar nach der Infektion (0 h p.i.) und zu den Zeitpunkten 8 h, 24 h, 48 h und 72 h p.i. im Plaque-Titrations-Test ermittelt (MOI = 0,1). Es konnte eine Zunahme der Anzahl infektiöser Viren im Überstand bis zum Zeitpunkt von 72 h p.i. beobachtet werden. In Abbildung 19 sind die 72 h p.i. erreichten Virus-Titer dargestellt. Wie auch auf Genomebene zeigt sich eine signifikant geringere Replikationseffizienz der Viren mit mutiertem p28 im Vergleich zu den Revertanten und dem Wildtyp-Virus. Dieser Replikationsdefekt ist bei der CPXV- $\Delta$ p28-Bln und der CPXV-tp28-Sac Mutante vergleichbar, bei der Mutante CPXV-mp28-Mod jedoch weniger ausgeprägt. Alle Revertanten zeigten eine dem Wildtyp-Virus vergleichbare Produktion von Nachkommen-Viren.



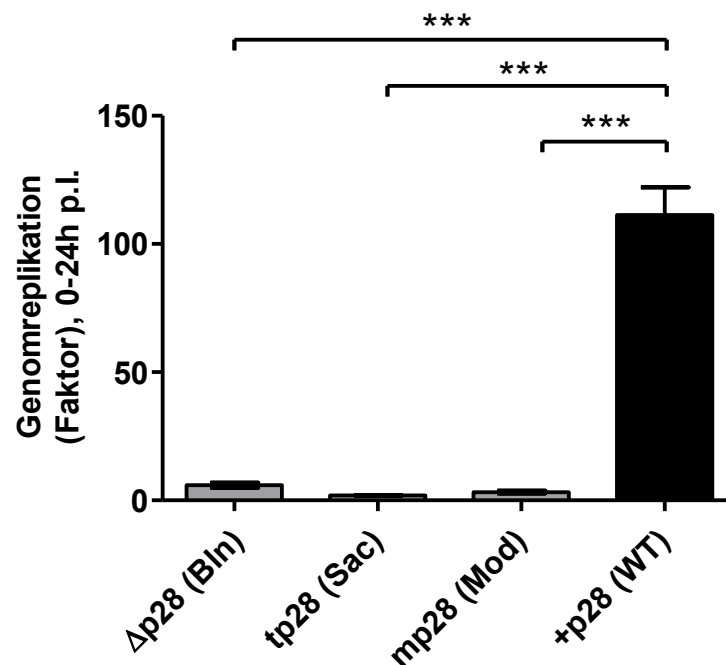
**Abbildung 19:** Anzahl infektiöser Partikel im Zellkulturüberstand infizierter J774A.1 Zellen, 72h p.i. (in PFU/ml). Statistik: *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Alle drei p28-Mutanten produzieren signifikant weniger Nachkommenviren als die Revertanten oder das Wildtyp-Virus.

### 3.6.6 Die Replikation von CPXV in primären Makrophagen ist p28-abhängig

Der p28-abhängige Replikationsdefekt, welcher in der murinen Makrophagen-Zelllinie J774A.1 gezeigt wurde, sollte in primären Makrophagen bestätigt werden. Hierzu wurde die Virusreplikation zunächst in primären peritonealen Makrophagen getestet, dem Zelltyp, in



dem die Attenuierung p28-defizienter ECTV ursprünglich beschrieben worden war (183). Hierzu wurden primäre Makrophagen aus dem Peritoneum männlicher Wistar-Ratten (*R. norvegicus*) mittels Peritoneal-Lavage gewonnen (s. 2.17.4). Die Zellen wurden vor Infektion für 24 h kultiviert. Die Infektion erfolgte mit einer MOI = 1,0. Die Anzahl intrazellulärer Virusgenome wurde mittels qPCR unmittelbar nach der Infektion (0 h p.i.) und 24 h p.i. gemessen und die Zunahme viraler Genomkopien mit der  $\Delta\Delta C_T$  Methode berechnet (Abb. 20). Ein Vergleich zwischen Mutanten und Wildtyp-Virus zeigt eine signifikant geringere Replikationseffizienz aller Mutanten.



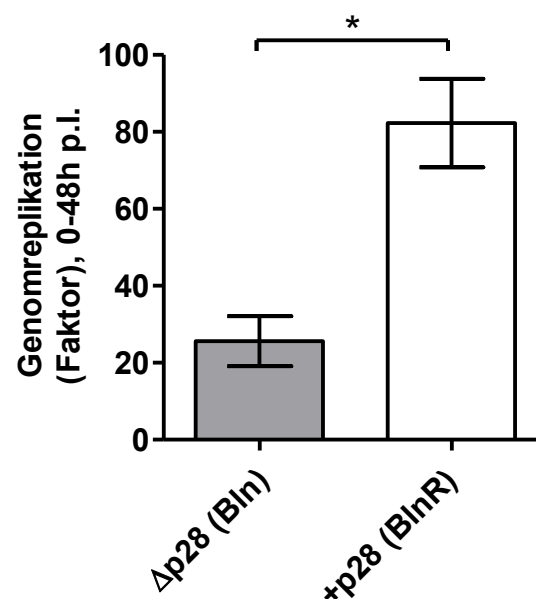
**Abbildung 20: Vervielfältigung des Virusgenoms p28-mutierter CPXV im Vergleich zum Wildtyp-Virus in primären peritonealen Makrophagen (*R. norvegicus*).** Dargestellt ist die Zunahme viraler Genome innerhalb von 24 h. Statistik: *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Alle drei Mutanten replizieren in peritonealen Makrophagen signifikant schlechter als das Wildtyp-Virus.

Diese Ergebnisse belegen die essentielle Funktion des p28 Proteins bei der Replikation von CPXV in Makrophagen bzw. Makrophagen-Zelllinien von Nagetieren, wie Ratte und Maus. Im Folgenden sollte daher die Replikationseffizienz von CPXV in primären humanen Makrophagen untersucht werden. Weiterhin sollte geklärt werden, ob das CPXV p28 Protein auch in humanen Makrophagen benötigt wird bzw. funktional ist, oder ob im Vergleich zu p28-Homologen humanpathogener OPV eine Spezies-spezifische Adaption vorliegen könnte.

Hierzu wurden CD14<sup>+</sup> Monozyten aus Spenderblut (*Buffy-Coat*) isoliert und kultiviert (s. 2.17.5/6). Die Differenzierung der CD14<sup>+</sup> Monozyten zu M1 bzw. M2 Makrophagen wurde durch Zugabe von GM-CSF (CSF2) oder M-CSF (CSF-1) zum Kulturmedium erreicht (s.

2.17.7). Nach 4-tägiger Kultivierung wurden die ausdifferenzierten Zellen mit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante bzw. der CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR Revertante infiziert (MOI = 0,1). Die Zunahme viraler Genomkopien zwischen den Zeitpunkten 0 h und 48 h p.i. wurde wie zuvor mittels qPCR und der  $\Delta\Delta$ cT Methode bestimmt.

In humanen M1 Makrophagen wies die CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante eine signifikant geringere Replikationseffizienz im Vergleich zur Revertante auf (Abb. 21). Hingegen war bei Infektion M-CSF-stimulierter M2 Makrophagen in keinem Fall eine produktive Virusreplikation zu erkennen (Daten nicht gezeigt). M2 Makrophagen waren weder gegenüber der Infektion mit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante, noch mit der Revertante oder dem Wildtyp-CPXV permissiv.



**Abbildung 21:** Vergleich der Genomreplikation von CPXV- $\Delta$ p28-Bln und CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR auf M1 Makrophagen aus primären CD14<sup>+</sup> Monozyten (*H. sapiens*). Dargestellt ist die Zunahme viraler Genome innerhalb von 48 h. Die  $\Delta$ p28 Mutante repliziert signifikant schlechter im Vergleich zur Revertante. Statistik: t-Test (ungepaart, 2-seitig).

### 3.7 Die Bedeutung der Apoptose bei der $\Delta$ p28-CPXV-Infektion

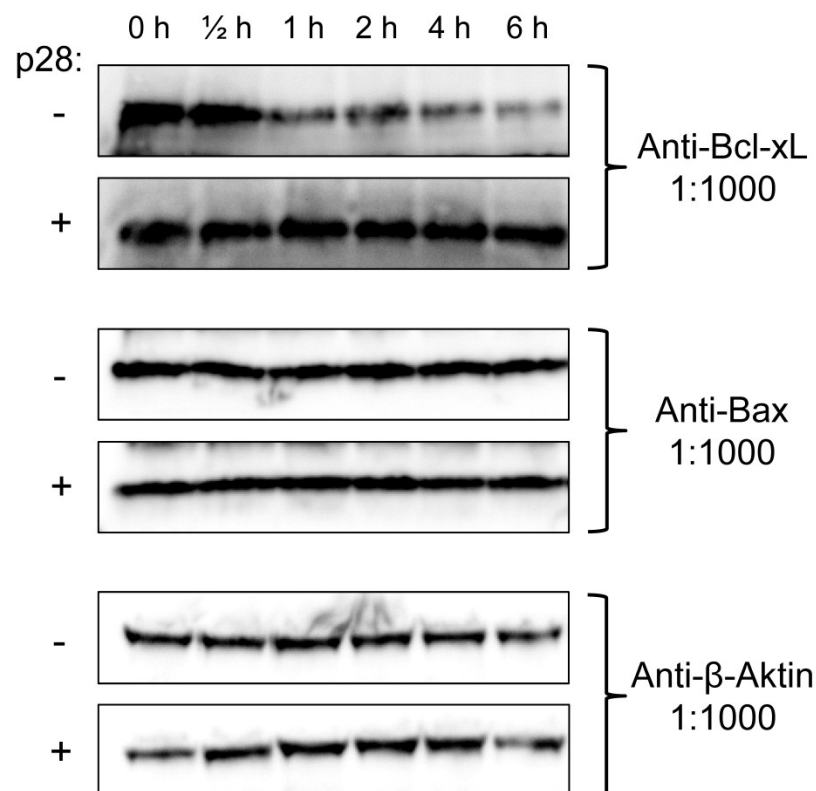
Aus der Literatur ist bekannt, dass p28 essentiell für die Fähigkeit von OPV ist, UV-induzierte Apoptose zu inhibieren (26). Es wurde vermutet, dass Virus-induzierte Apoptose die Ursache für die abortive Infektion von Makrophagen mit  $\Delta$ p28-Viren darstellt. Daher sollte untersucht werden, ob eine Infektion mit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante im Vergleich zur Revertante verstärkt apoptotische Prozesse in Makrophagen induziert. Als Modellsystem dienten J774A.1 Zellen.

Zur Untersuchung der Bedeutung apoptotischer Prozesse für die Funktion von p28 wurde:

- Die Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine in infizierten Zellen untersucht (3.7.1)
- Die Möglichkeit zur Wiederherstellung der Replikationsfähigkeit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante in Makrophagen durch Hemmung der Apoptose analysiert (3.7.2)
- Die Apoptoseinduktion in infizierten Zellen quantifiziert (3.7.3)

### 3.7.1 Reduktion von Bcl-xL in CPXV- $\Delta$ p28-Bln-infizierten J774A.1 Zellen

Im Folgenden wurde die Expression verschiedener Apoptose-relevanter Proteine in infizierten J774A.1 Zellen im zeitlichen Verlauf der Infektion mittels Western-Blot analysiert (Abb. 22). Es konnte eine reduzierte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL in CPXV- $\Delta$ p28-Bln-infizierten J774A.1 Zellen festgestellt werden. Bereits 1 h nach Infektion ist eine deutliche Reduktion der Bcl-xL Menge im Vergleich zum Zustand vor der Infektion festzustellen, die auch zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h und 6 h p.i. anhält. In CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR infizierten Zellen ist hingegen keine Reduktion der Bcl-xL Expression zu erkennen. Der reduzierten Expression des anti-apoptotischen Bcl-xL Proteins steht eine stabile Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax gegenüber.

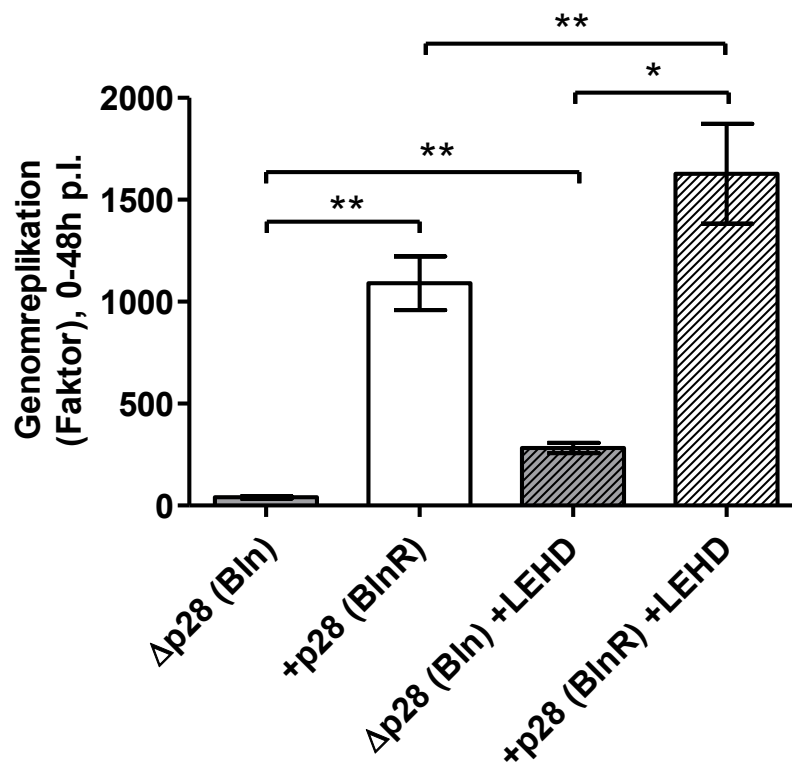


**Abbildung 22:** Expression von Bcl-xL und Bax nach Infektion von J774A.1 Zellen mit CPXV- $\Delta$ p28-Bln (-) oder CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR (+). Proteinextrakte wurden zu angegebenen Zeitpunkten p.i. erstellt. Detektion im Western-Blot mit den angegebenen Antikörper-Verdünnungen. Erläuterungen im Text.

### 3.7.2 Replikation von CPXV- $\Delta$ p28-Bln in Gegenwart von Z-LEHD-fmk

Die Reduktion des anti-apoptotischen Bcl-xL Proteins in CPXV- $\Delta$ p28-Bln-infizierten Zellen deutet auf einen pro-apoptotischen Stimulus hin. Daher wurde untersucht, ob die Apoptose infizierter Zellen die Ursache der eingeschränkten Replikationsfähigkeit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante in J774A.1 Zellen darstellt. Hierzu wurde die Möglichkeit einer Wiederherstellung der Replikationsfähigkeit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante in Makrophagen durch Hemmung der Caspase-Kaskade analysiert.

Die Zellen wurden 1 h vor der Infektion mit dem Caspase-9 Inhibitor Z-LEHD-fmk (20  $\mu$ M) vorinkubiert. Die Infektion mit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante, der Revertante und dem Wildtyp-Virus erfolgte mit einer MOI = 0,1 ebenfalls in Gegenwart von Z-LEHD-fmk (20  $\mu$ M). Nach Adsorption der Viren (1 h) wurden die Zellen 2 $\times$  in PBS gewaschen und frisches Medium hinzugegeben, welches mit Z-LEHD-fmk (20  $\mu$ M) versehen war. Zur Charakterisierung der Virusreplikation wurde erneut direkt nach der Virusadsorption (0 h p.i.) und 48 h p.i. die Gesamt-DNA extrahiert und die Menge viraler Genome mittels qPCR in Kombination mit der  $\Delta\Delta$ Ct Methode analysiert (Abb. 23).



**Abbildung 23:** Vergleich der Genomreplikation von CPXV- $\Delta$ p28-Bln und CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR  $\pm$  Z-LEHD-fmk in J774A.1 Zellen. Dargestellt ist die Zunahme viraler Genome innerhalb von 48 h. Statistik: t-Test (ungepaart, 2-seitig). Inhibition von Caspase-9 ist nicht ausreichend um den Replikationsdefekt der  $\Delta$ p28 Mutante auszugleichen.

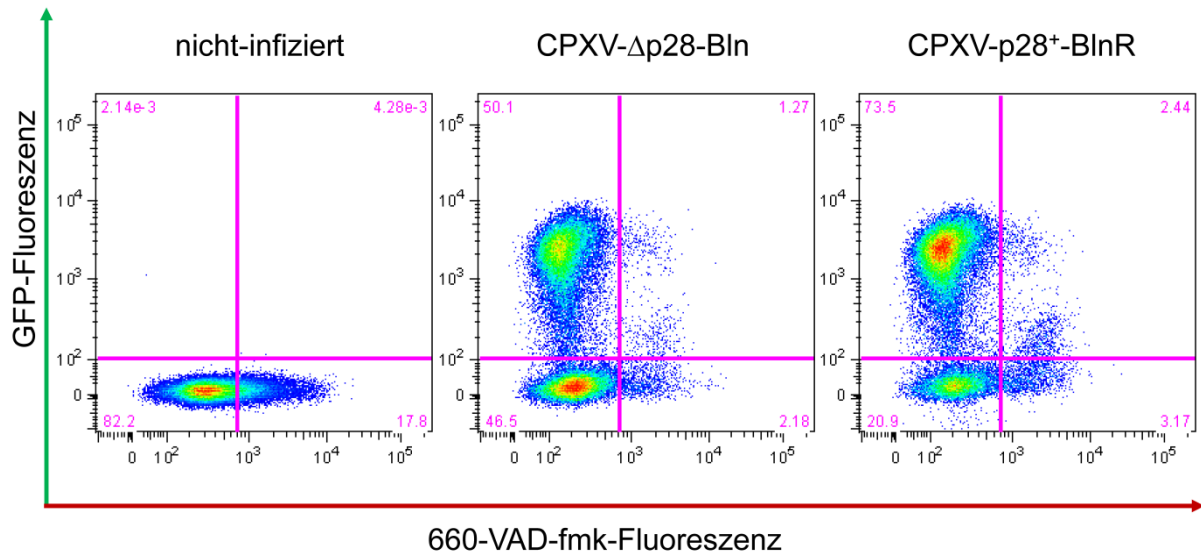
Nach Zugabe von Z-LEHD-fmk trat eine signifikante Steigerung der Genomreplikation der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante gegenüber der nicht behandelten Kontrolle auf. Die Inhibierung von Caspase-9 mittels Z-LEHD-fmk war jedoch nicht ausreichend, um das Niveau der Genomreplikation der Mutante auf das der Revertante anzuheben.

In einem weiteren Versuch wurde der Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk an Stelle von Z-LEHD-fmk in einem ansonsten identischen Versuchsaufbau verwendet. Es sollte eine Beteiligung des Caspase-9-unabhängigen extrinsischen Apoptose-Signalwegs untersucht werden. Jedoch war auch nach Zugabe von Z-VAD-fmk keine weitere Steigerung der Replikation der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante im Vergleich zu Z-LEHD-fmk zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Auch in Gegenwart des Pan-Caspase-Inhibitors replizierte CPXV- $\Delta$ p28-Bln signifikant schlechter als die Revertante CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR. Die Inhibition der Apoptose ist demzufolge nicht ausreichend um den Replikationsdefekt der  $\Delta$ p28 Mutante auszugleichen.

### 3.7.3 Quantifizierung Virus-induzierter Apoptose in J774A.1 Zellen

Um Virus-induzierte Apoptose als Ursache des Replikationsdefekts der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante auszuschließen, sollte die Apoptoserate von J774A.1 Zellen nach Infektion mit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante bzw. mit der Revertante verglichen werden. Die Infektion erfolgte mit einer MOI = 5, um eine Infektion aller Zellen zu erreichen. Zur Quantifizierung der Apoptoserate wurden aktive Caspasen in den Zellen durch Zugabe des Fluorochrom-konjugierten Caspase-Inhibitors 660-VAD-fmk (Immunochemistry Technologies) zum Kulturmedium gefärbt. Das Verfahren war zuvor in Bezug auf den Nachweis OPV-induzierter Apoptose validiert worden (22). Die Färbung aktiver Caspasen erfolgte 6 h bzw. 24 h nach Infektion (s. 2.17.10). In Abbildung 24 sind die Ergebnisse für den Zeitpunkt 24 h p.i. dargestellt. Lediglich bei nicht-infizierten Kulturen konnte Caspase-Aktivität in einigen Zellen nachgewiesen werden (insgesamt 17,8 %). Diese Rate war nach Infektion sowohl mit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante (3,45 %), als auch mit der Revertante (5,61 %) deutlich reduziert. Virus-induzierte Apoptose konnte somit in J774A.1 Zellen nicht festgestellt werden.

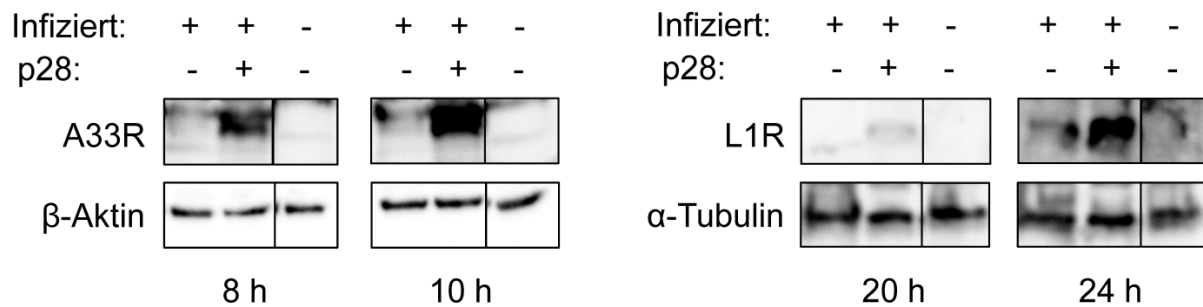
Auffällig war, dass der Anteil GFP-exprimierender Zellen auch 24 h p.i. nur 51,37 % in CPXV- $\Delta$ p28-Bln infizierten Kulturen und 75,94 % in CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR infizierten Kulturen betrug. Zum Zeitpunkt 6 h p.i. waren es 8,83 % der Zellen nach CPXV- $\Delta$ p28-Bln-Infektion und 20,26 % nach CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR-Infektion. Trotz der hohen MOI scheinen nicht alle Zellen erfolgreich infiziert zu werden, bzw. scheinen die Viren nicht in allen infizierten Zellen die späte Phase der Transkription zu erreichen, in der die GFP-Expression stattfindet.



**Abbildung 24: FACS Analyse der Caspase-Aktivität in infizierten J774A.1 Zellen 24 h p.i.** Dargestellt ist der Anteil GFP-exprimierender, infizierter Zellen und 660-VAD-fmk gefärbter, apoptotischer Zellen nach Infektion mit CPXV- $\Delta$ p28-Bln oder CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR. Ungefärbte Zellen sind im unteren linken Quadranten, infizierte Zellen im oberen linken, apoptotische infizierte Zellen im oberen rechten und apoptotische nicht-infizierte Zellen im unteren rechten Quadranten dargestellt. Sowohl nach Infektion mit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante, als auch nach Infektion mit der CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR Revertante ist eine Reduktion der Caspase-Aktivität im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen zu beobachten. Es trat keine gesteigerte Apoptoserate CPXV- $\Delta$ p28-Bln-infizierter J774A.1 Zellen auf. GFP-Fluoreszenz wurde nach Anregung mit dem 488 nm Laser im FITC-Kanal, 660-VAD-fmk-Fluoreszenz nach Anregung mit dem 633nm Laser im A647-Kanal detektiert. Es wurden je 50.000 Zellen gemessen.

### 3.8 Analyse der Expression früher und später Virus-Proteine in J774A.1 Zellen

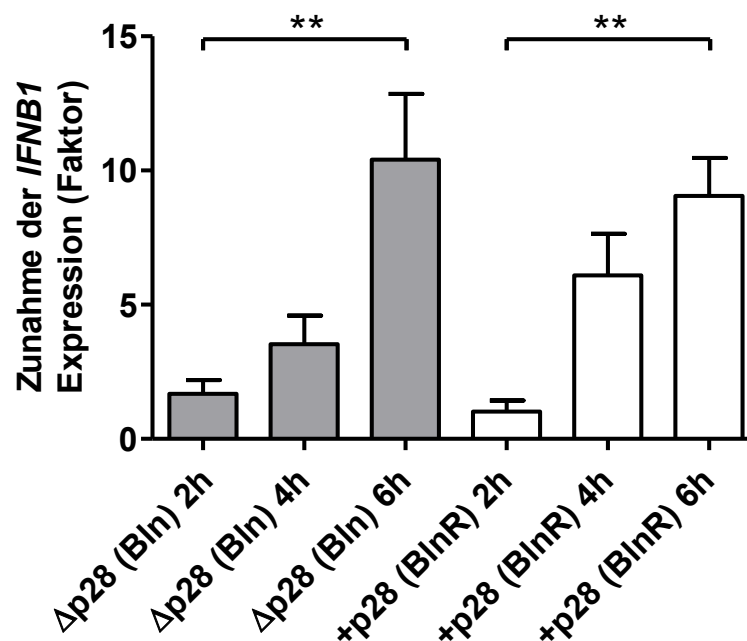
Da Virus-induzierte Apoptose als Ursache des Replikationsdefekts der p28-mutierten CPXV in J774A.1 Makrophagen ausgeschlossen werden konnte, sollte untersucht werden, ob frühe oder späte virale Proteine in CPXV- $\Delta$ p28-Bln infizierten Zellen weniger effizient gebildet werden. Der geringere Anteil GFP-exprimierender Zellen nach CPXV- $\Delta$ p28-Bln-Infektion im Vergleich zu CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR-Infektion (s. 3.7.3) legt nahe, dass die Infektion mit den p28-mutierten Viren häufig nicht die späte Phase der Replikation erreicht. Daher wurde die Expression des frühen viralen A33R Proteins und des späten viralen L1R Proteins im Western-Blot untersucht. Hierzu wurden J774A.1 Zellen mit CPXV- $\Delta$ p28-Bln oder CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR infiziert (MOI = 1,0). Zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. wurden Gesamtproteinextrakte erstellt. Zum Zeitpunkt 8 h p.i. konnte das virale A33R Protein nachgewiesen werden, L1R hingegen frühestens 20 h nach Infektion (Abb. 25). Die Expression von A33R und L1R war nach Infektion mit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante deutlich schwächer, als nach Infektion mit der Revertante CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR.



**Abbildung 25: Expression des frühen viralen A33R und des späten viralen L1R Proteins in infizierten J774A.1 Zellen.** J774A.1 Zellen wurden mit CPXV-Δp28-Bln (-p28) oder CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR (+p28) infiziert (MOI = 1) und die Proteinexpression im Western-Blot zu den angegebenen Zeiten p.i. untersucht. Als Ladekontrollen dienten β-Aktin oder α-Tubulin. Die Expression von A33R und L1R Protein war in CPXV-Δp28-Bln-infizierten Zellen deutlich reduziert, im Vergleich zur Infektion mit der CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR Revertante.

### 3.9 Analyse der Interferon-Genexpression infizierter J774A.1 Zellen

In Anbetracht der frühen Hemmung der CPXV-Δp28-Bln Infektion in J774A.1 Zellen sollte untersucht werden, ob der Replikationsdefekt auf einen Interferon-abhängigen antiviralen Effekt zurückgeht. Um die zelluläre Interferon-Antwort auf eine CPXV-Δp28-Bln-Infektion zu analysieren, wurde die Genexpression der Typ-I Interferon-Gene *IFNA1/2/5/6*, *IFNB1* und *IFNK* und des Typ-II Interferon-Gens *IFNG* mittels qPCR in CPXV-Δp28-Bln-, CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR- (MOI = 1) oder nicht-infizierten Zellen verglichen (s. Abb. 26).



**Abbildung 26: Zunahme der *IFNB1* Genexpression nach Infektion von J774A.1 Zellen mit CPXV-Δp28-Bln oder CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen.** Berechnet mit der ΔΔCt Methode nach Normalisierung auf *MYC*-Genexpression. Statistik: *One-Way ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Sowohl in CPXV-Δp28-Bln-, als auch in CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR-infizierten Zellen stieg die Expression des *IFNB1* Gens im Infektionsverlauf vergleichbar an.

Im Fall von *IFNA1/2/5/6*, *IFNK* und *IFNG* konnte kein signifikanter Anstieg der Genexpression nach Infektion im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Lediglich die *IFNBI* Expression stieg nach Infektion signifikant an (Abbildung 26). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Infektion mit CPXV-Δp28-Bln oder mit CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR beobachtet werden.

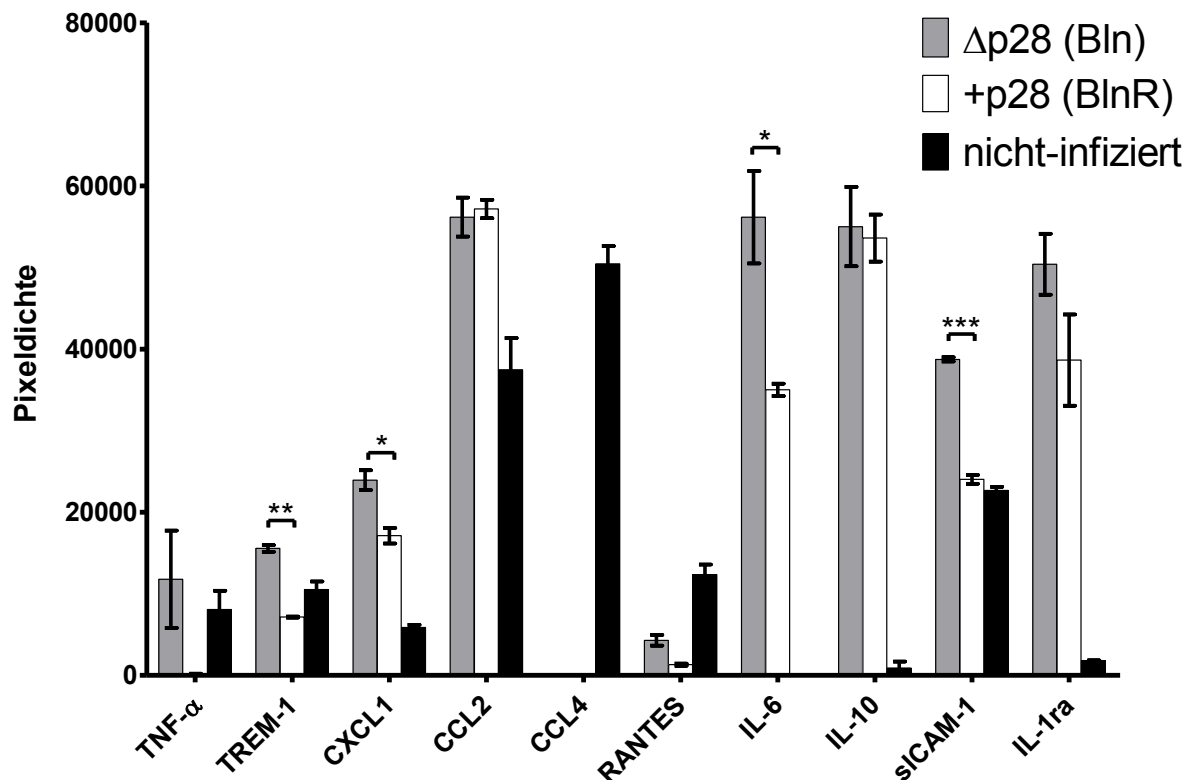
### 3.10 Analyse der Cytokin-Sekretion infizierter J774A.1 Zellen

Da weder Virus-induzierte Apoptose noch ein antiviraler Effekt der Interferon-Antwort als Ursache des Replikationsdefekts der CPXV-Δp28-Bln Mutante bestätigt werden konnten, wurde der Aktivierungszustand der infizierten Zellen analysiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass Bcl-xL in Makrophagen nicht nur als anti-apoptotischer Überlebensfaktor, sondern auch als anti-inflammatorischer Faktor wirkt (11). Eine Reduktion der Bcl-xL Expression in Makrophagen kann daher sowohl pro-apoptotisch wirken, als auch die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine fördern.

Um die möglichen Auswirkungen einer reduzierten Bcl-xL Expression nach Infektion mit der CPXV-Δp28-Bln Mutante auf die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine zu charakterisieren wurde das Cytokin-Profil von CPXV-Δp28-Bln-, CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR- und CPXV-WT-infizierten Zellen, sowie nicht-infizierter J774A.1 Zellen analysiert. Die Konzentrationen 36 muriner Cytokine im Zellkulturüberstand wurden hierzu 6 h p.i. mittels des *Proteome Profiler™ Mouse Cytokine Array, Panel A* (R&D Systems) analysiert. Die Expression der 10 Cytokine, welche am stärksten sezerniert wurden, ist in Abbildung 27 dargestellt.

Generell ist nach Infektion, sowohl mit der Mutante, als auch mit der Revertante, ein starker Anstieg der Sekretion von CXCL1, CCL2 (MCP-1), IL-6, IL-10 und IL-1ra zu erkennen. Weiterhin bewirkt Infektion mit beiden Viren eine starke Reduktion der CCL4 (MIP-1β) Sekretion. Unterschiede zwischen CPXV-Δp28-Bln und CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR zeigen sich vorrangig in einer stärkeren Sekretion von IL-6 und sICAM-1 und in geringerem Maße von TREM-1, IL-1ra und TNF-α durch CPXV-Δp28-Bln-infizierte J774A.1 Zellen.





**Abbildung 27: Cytokin-Sekretion infizierter J774A.1 Zellen.** Relative Cytokin-Konzentrationen im Zellkulturüberstand (6 h p.i.). Insbesondere die Cytokine IL-6 und sICAM-1 werden signifikant stärker durch Infektion mit CPXV-Δp28-Bln induziert, als durch die Revertante oder das Wildtyp-Virus. Statistik: t-Test (ungepaart, 2-seitig).

### 3.11 Identifizierung zellulärer und viraler Interaktionspartner des p28 Proteins

Zur genaueren Charakterisierung der Funktion des p28 Proteins sollten mögliche Interaktionspartner bzw. Substrate für die Ubiquitinligase-Aktivität des p28 Proteins identifiziert werden. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Verfahren zur ungerichteten Suche nach spezifischen Interaktionspartnern verwendet:

- 1) *Yeast-2-Hybrid Screening*
- 2) *Pull-down Analyse* in Kombination mit massenspektrometrischer Protein-Identifizierung

#### 3.11.1 Suche nach zellulären Interaktionspartnern im *Yeast-2-Hybrid Screening*

Im *Yeast-2-Hybrid* (Y2H) *Screening* wurde das p28 Protein aus dem Kamelpockenvirus Stamm CP19 als Köderprotein („*bait*“) verwendet, welches in Fusion mit einer N-terminalen GAL4-DNA-Bindedomäne über den *bait*-Expressionsvektor pGBKT7 im *S. cerevisiae* Stamm Y2HGold exprimiert wurde. Die Expression des Fusionsproteins in der Hefe wurde im Western-Blot verifiziert (Daten nicht gezeigt). Eventuelle Toxizität der *bait*-Expression, sowie

autonome Aktivierung der Reportergene durch das *bait*-Protein allein, wurden, wie im Herstellerprotokoll beschrieben, analysiert und konnten ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Zur Identifizierung zellulärer Interaktionspartner wurde eine normalisierte universale humane Expressionsbibliothek verwendet (*Pretransformed Normalized Matchmaker™ Human Universal cDNA Library*, Clontech Laboratories). Die Bibliothek kodiert mögliche zelluläre Ziel-Proteine („*prey*“) in Fusion mit der GAL4-Aktivierungsdomäne. Sie liegt im *prey*-Expressionsvektor pGADT7-RecAB im *S. cerevisiae* Stamm Y187 vor. Für das Y2H *Screening* wurde eine Kreuzung zwischen dem p28-exprimierenden Stamm Y2HGold und dem, die *prey*-Bibliothek exprimierenden, Stamm Y187 vorgenommen (s. 2.16.1). Positive Klone wurden durch zweifache Selektion auf Prototrophie (Trp, Leu, Ade, His) und Aureobasidin A-Resistenz identifiziert und das exprimierte *prey*-Protein durch Sanger-Sequenzierung des Inserts im Expressionsvektor pGADT7-RecAB identifiziert. Das Y2H *Screening* wurde zweimal durchgeführt. *Prey*-Proteine, die in beiden Replikaten identifiziert werden konnten, sind in Tabelle 23 aufgeführt.

**Tabelle 23: Im Yeast-2-Hybrid Screening identifizierte potentielle p28-Interaktionspartner**

Funktion	Gen-Symbol	Lokalisierung	Interaktion verifiziert (Pull-down Test*)
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Transport	<i>ATP1B1</i>	Zellmembran	n.d.
Translationsinitiation	<i>COPS5</i>	Zytoplasma	<b>nein</b>
	<i>EIF1B</i>	unbekannt	<b>ja</b>
Elektronentransportkette	<i>ETFA</i>	Zytoplasma	n.d.
Zell-Überleben	<i>HAX1</i>	Zytoplasma	n.d.
unbekannt	<i>LRRC6</i>	Zytoplasma	n.d.
Muskelkontraktion	<i>MYH11</i>	Zytoplasma	n.d.
Glucose-Stoffwechsel	<i>PGM1</i>	Zytoplasma	n.d.
Ubiquitinierung	<i>UBE2N</i>	Zytoplasma	<b>nein</b>
	<i>USP8</i>	Zytoplasma	n.d.

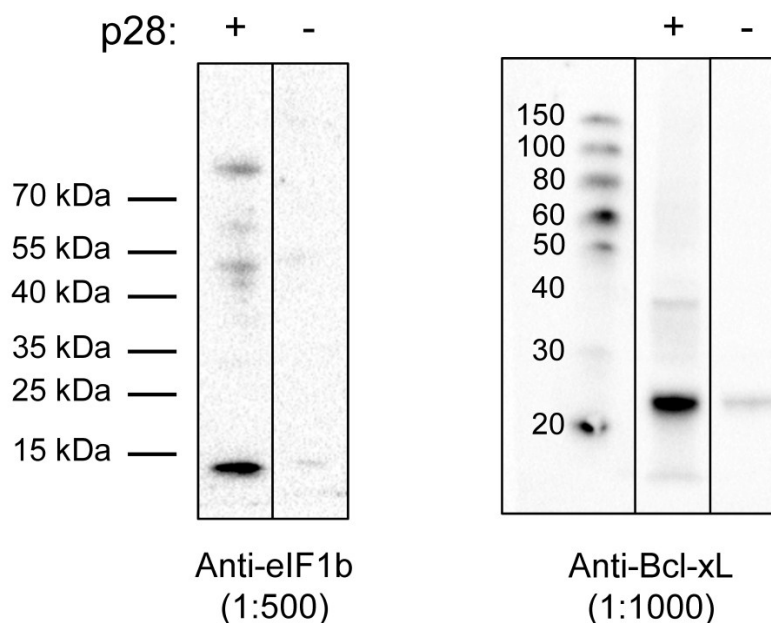
n.d. = nicht durchgeführt; \*s. 3.11.2

Zur weiteren Analyse wurden die, an der Translationsinitiation beteiligten, Gene *COPS5* und *EIF1B*, sowie *UBE2N* ausgewählt. Das *UBE2N* Gen kodiert ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym, welches *in vitro* mit der Ubiquitinligase p28 zusammenwirken kann (93). Die Verifizierung der Ergebnisse des Y2H *Screenings* erfolgte im *Pull-down* Test.

### 3.11.2 Suche nach zellulären oder viralen Interaktionspartnern im *Pull-down* Test

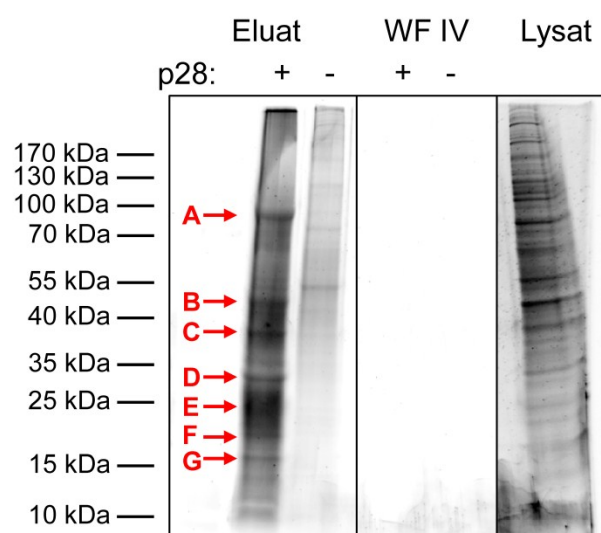
Als Ergänzung und zur Verifizierung der Ergebnisse des Y2H *Screenings* wurde mittels *Pull-down* Test nach zellulären oder viralen Interaktionspartnern des p28 Proteins gesucht. Hierzu wurde rekombinant in *E. coli* hergestelltes p28 Protein (aus CPXV BR) über einen His-Tag an

*Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown beads* (Invitrogen) gekoppelt. Die *beads* mit gebundenem p28 Protein wurden zusammen mit Proteinextrakten von nicht-infizierten bzw. CPXV- $\Delta$ p28-Bln-infizierten J774A.1 Zellen inkubiert (10 min, RT). Als Kontrolle dienten *beads* ohne gebundenes p28. Ungebundenes Protein wurde durch viermaliges Waschen entfernt. Anschließend wurden die gebundenen Proteinkomplexe eluiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Verifizierung der Ergebnisse aus dem Y2H *Screening* wurden zunächst Antikörper gegen die im Y2H *Screening* identifizierten, möglichen Interaktionspartner verwendet. Dabei konnte keine Interaktion zwischen p28 und dem vom *COPS5* Gen kodierten SGN5 Protein (*COP9 signalosome complex subunit 5*) festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch eine Interaktion zwischen p28 und dem Ubiquitin-konjugierendem Enzym E2 N konnte nicht belegt werden (Daten nicht gezeigt). Lediglich die im Y2H *Screening* identifizierte Interaktion zwischen p28 und dem Protein eIF1b (*eukaryotic translation initiation factor 1b*, *EIF1B* Gen) konnte im *Pull-down* Test bestätigt werden (Abb. 28). Weiterhin wurde eine mögliche Interaktion zwischen p28 und dem Bcl-xL Protein untersucht, welches in seiner Expression durch p28 beeinflusst wurde (s. 3.7.1). Hierbei konnte eine Interaktion zwischen p28 und Bcl-xL im *Pull-down* Test gezeigt werden (Abb. 28).



**Abbildung 28: Pull-down Analyse der Interaktion zwischen p28 und eIF1b bzw. Bcl-xL.** Mögliche Interaktionspartner des p28 Proteins wurden über rekombinantes p28 Protein aus dem Zellextrakt infizierter J774A.1 Zellen isoliert. Die isolierten Proteine wurden im Western-Blot analysiert. Der Nachweis von eIF1b oder Bcl-xL im p28-Eluat (+) oder Kontroll-Eluat (-) erfolgte mit einem anti-eIF1b bzw. anti-Bcl-xL Antikörper. Die erwartete Masse von eIF1b beträgt ca. 12,8 kDa, jene von Bcl-xL ca. 26 kDa. In beiden Fällen ist eine spezifische Anreicherung über die p28-*beads* zu erkennen, während im Kontroll-Eluat nur wenig eIF1b oder Bcl-xL nachweisbar ist.

Zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner wurden die p28-Eluate und Kontroll-Eluate in der SDS-PAGE aufgetrennt und alle Proteine im Gel mit dem *Flamingo*<sup>TM</sup> *Fluorescent Gel Stain* (Bio-Rad Laboratories) detektiert. Es konnten keine Unterschiede zwischen der Verwendung von Lysaten infizierter und nicht-infizierter Zellen anhand des Bandenmusters festgestellt werden. Zur Kontrolle auf Kontaminationen wurden auch die Waschfraktionen in der SDS-PAGE untersucht. Ab dem 3. Waschschriff konnte kein Protein mehr im Waschpuffer identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Das Bandenmuster, welches bei Verwendung von Lysaten infizierter Zellen erhalten wurde, ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Identifizierung der möglichen Interaktionspartner erfolgte über Massenspektrometrie (s. 2.19.7). Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse sind in Tabelle 24 aufgeführt.



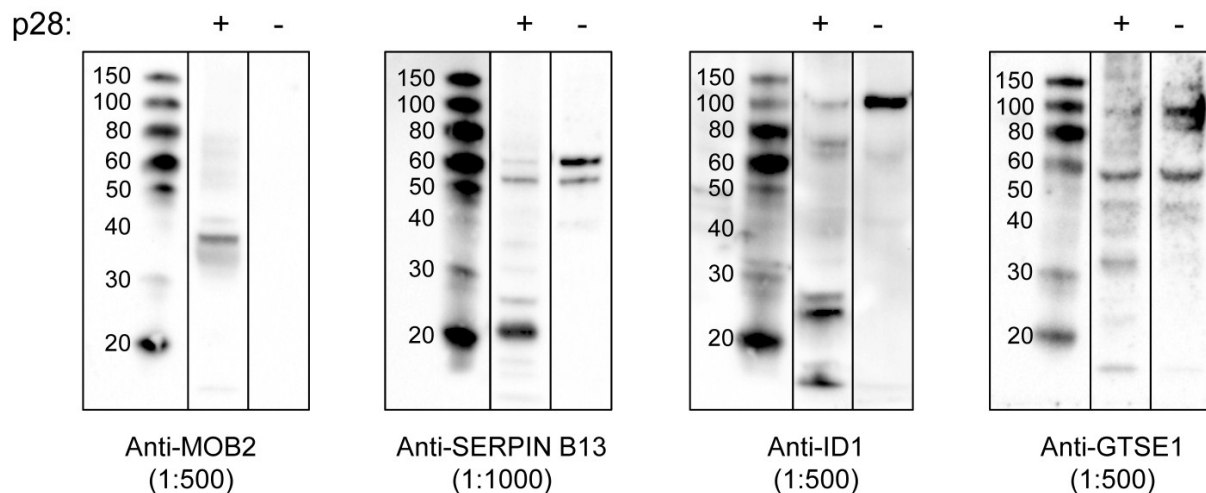
**Abbildung 29: Pull-down Test.** Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner des p28 Proteins wurden die p28-Eluate (+) und Kontroll-Eluate (-) zusammen mit den letzten Waschfraktionen (WF IV) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und alle enthaltenen Proteine mittels Gesamtproteinfärbung detektiert. Zum Vergleich ist das verwendete Lysat infizierter J774A.1 Zellen aufgetragen. Banden, die mittels Massenspektrometrie identifiziert werden sollten, sind rot gekennzeichnet. Links sind die Molekulargewichte des Standards in kDa angegeben.

**Tabelle 24: Im Pull-down Test mittels Massenspektrometrie identifizierte p28-Interaktionspartner**

	UniProt ID (Maus)	Protein	Score	Masse (Da)
A	DPYL4	Dihydropyrimidinase-related protein 4	33	61922
	RIOK1	Serine/threonine-protein kinase RIO1	33	64869
B	ZN536	Zinc finger protein 536	42	141487
	ID1	DNA-binding protein inhibitor ID-1	36	17902
C	SPB13	Serpin B13	50*	44288
D	SETD5	SET domain-containing protein 5	36	157329
	GTSE1	G2 and S phase-expressed protein 1	36	78703
E	MLL2	Histone-lysine N-methyltransferase MLL2	41	599870
	HIRP3	HIRA-interacting protein 3	41	65176
F	CGL	Cystathionine gamma-lyase	42	43539
G	MOB2	MOB kinase activator 2	48*	26834

Banden A-G entsprechend zu Abb. 29; \*zusätzlich über *peptide mass fingerprint* (PMF) identifiziert.

Die Identifizierung der Proteinbanden in der Massenspektrometrie ergab teilweise mehrere Treffer. In diesem Fall wurden Treffer nach dem *Score* oder der Übereinstimmung zwischen erwarteter Größe des identifizierten Proteins und der tatsächlichen Größe der Bande in der SDS-PAGE ausgewählt. Bei den ausgewählten Proteinen wurde die massenspektrometrische Identifizierung im Western-Blot überprüft. Hierzu wurden die Eluate des p28-*Pull-down* Tests oder des Kontroll-*Pull-down* Tests erneut in der SDS-PAGE aufgetrennt und ko-eluiertes Protein mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (s. Abb. 30).



**Abbildung 30: Identifizierung möglicher Interaktionspartner des p28 Proteins mittels Pull-down Test.** Dargestellt ist die Western-Blot Analyse der Pull-down Eluate. Der Pull-down erfolgte entweder mit p28 Protein (+) oder mit unbeschichteten beads (-). Die angegebenen Antikörper wurden zur Detektion im Western-Blot verwendet. Die linke Bande zeigt den Molekulargewichts-Standard. Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

Es konnte eine spezifische Anreicherung des Proteins *MOB kinase activator 2* (MOB2) über p28 im Pull-down Test festgestellt werden. Das Protein wurde allerdings nicht auf der erwarteten Höhe von ca. 27 kDa, sondern bei ca. 40 kDa detektiert. Ebenso zeigte sich eine Anreicherung des SERPIN B13 Proteins, welches bei ca. 20 kDa detektiert wurde. Dies entspricht der Masse der Isoform 2 des SERPIN B13 Proteins. Es wurden hierbei aber sowohl im p28-, als auch im Kontroll-Eluat unspezifische Banden zwischen 50 und 60 kDa detektiert. Im Fall von ID1 konnten Banden im p28-Eluat bei < 20 kDa, sowie bei ca. 25 kDa detektiert werden und somit auch im Bereich der erwarteten Masse von ca. 16 kDa. Eine starke unspezifische Bande trat zudem im Kontroll-Eluat bei ca. 100 kDa auf. Das GTSE1 Protein konnte nicht bei der erwarteten Masse von ca. 77 kDa detektiert werden, eine spezifische Anreicherung von GTSE1 über p28 fand nicht statt. Zusammenfassend konnten die zellulären Proteine Bcl-xL, eIF1b und ID1 als putative Interaktionspartner des viralen p28 Proteins identifiziert werden. Zudem konnten Hinweise auf eine mögliche Interaktion von p28 mit den zellulären Proteinen MOB2 und SERPIN B13 gewonnen werden.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Virus-Wirtszell-Interaktionen der OPV untersucht. Hierbei lag der Fokus auf den OPV, welche in den letzten Jahren zunehmend als Erreger zoonotischer Infektionen des Menschen an Bedeutung gewonnen haben. Seit dem Ende der Impfkampagne gegen Pocken und mit dem abnehmenden Impfschutz der Bevölkerung sind insbesondere VACV, CPXV und MPXV als Krankheitserreger hervorgetreten (66). Alle drei Viren weisen im Menschen eine deutlich geringere Pathogenität im Vergleich zum ausgerotteten VARV auf. Allerdings ist eine Eradikation dieser Viren, im Gegensatz zum humanspezifischen VARV, aufgrund ihres breiten Wirtsbereichs ausgeschlossen. Als eine potentielle zukünftige Bedrohung der öffentlichen Gesundheit gelten insbesondere CPXV, da diese, neben ihrem ungewöhnlich breiten Wirtsbereich, auch das größte Repertoire an akzessorischen Genen innerhalb der OPV aufweisen (4). Hierunter fällt insbesondere eine Vielzahl immunmodulatorischer Gene, die teilweise auch bei anderen OPV, wie VARV, gefunden werden, in vielen Fällen aber einzigartig sind (4, 181). Unter der Annahme, dass die Virulenz eines Virus insbesondere durch die Fähigkeit definiert wird, die Immunantwort des Wirts zu modulieren, sind das pathogene Potential von CPXV und die Möglichkeit zur Adaption an neue Wirtsspezies daher von besonderem Interesse.

**Die spezifische Modulation der zellulären Genexpression durch VACV, CPXV und MPXV** wurde in dieser Arbeit vergleichend analysiert. Hierbei wurden Unterschiede erwartet, da sich alle drei Viren zueinander in ihrem Repertoire an akzessorischen Genen und teilweise auch in der Adaption dieser Faktoren an spezifische Wirtsspezies unterscheiden (76). Inwiefern die genannten Viren an den Menschen als Wirtsspezies angepasst sind, ist unklar. Da jedoch bekannt ist, dass die Pathogenität zoonotischer OPV in Abhängigkeit von der jeweiligen Wirtsspezies stark variieren kann (94), ist davon auszugehen, dass eine Adaption viraler regulatorischer Mechanismen an spezifische Wirtsspezies erfolgt. Daher wurden humane Zellen ausgewählt, um die Modulation zellulärer Signalwege und Mechanismen durch VACV, CPXV und MPXV vergleichend zu untersuchen.

Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass OPV generell das Potential besitzen, antivirale Mechanismen der Wirtsabwehr zu unterdrücken, den Zelltod zu inhibieren oder zu verzögern und die Mechanismen der Wirtszelle für ihre Reproduktion zu verwenden (143, 181, 201). Das Wissen über diese Mechanismen stammt allerdings überwiegend aus Studien unter Verwendung von VACV. Einige jüngere Studien befassten sich mit MPXV (3, 174),

insbesondere nach dem MPXV Ausbruch in den USA 2003 (168). Über Unterschiede in der Virus-Wirtszell-Interaktion zwischen VACV und MPXV und noch mehr zwischen CPXV, MPXV und VACV ist jedoch bisher wenig bekannt.

#### 4.1 Das Genexpressionsprofil VACV-, CPXV- und MPXV-infizierter Zellen

Zur Analyse der zellulären Genexpression infizierter humaner epithelialer (HeLa) Zellen wurde der Zeitpunkt 6 h p.i. ausgewählt. Hierdurch sollte das Genexpressionsprofil der Wirtszelle nach erfolgreicher Penetration der Zelle und zu Beginn der Virusreplikation, aber vor dem Ende des Replikationszyklus und der Lyse der Zellen und einhergehender Degradation der RNAs erfasst werden (143, 174). Weiterhin beschreiben frühere Studien, dass die Virus-induzierte Modulierung der zellulären Genaktivität insbesondere in den ersten Stunden der Infektion bis ca. 6 h p.i. abläuft, während zu späteren Zeitpunkten eine unspezifische Herabregulierung zellulärer Gene vorherrscht (80, 81). Zur Infektion wurden der, in der Maus virulente, VACV Stamm IHD-W (42), der CPXV Referenzstamm Brighton Red (BR) und der hochpathogene MPXV Stamm MSF-6 (137) verwendet.

**Das Genexpressionsprofil infizierter HeLa Zellen wies nur wenige Abweichungen gegenüber nicht-infizierten Zellen auf**, ungeachtet der Infektion und damit einhergehender morphologischer Veränderungen. Obwohl dies nach Infektion mit allen drei getesteten OPV beobachtet wurde, war die Reaktion der Wirtszelle auf eine MPXV-Infektion besonders gering, was ebenso nach MPXV-Infektion anderer Zelltypen beschrieben wurde (174). Dieser Effekt könnte auf eine besonders effektive „Tarnung“ im Fall einer MPXV-Infektion schließen lassen, welche die Erkennung der Infektion durch die Zelle bzw. die Antwort auf die beginnende Infektion erfolgreich unterläuft. Interessanterweise konnte 6 h nach Infektion von HeLa Zellen keine generelle Reduktion zellulärer mRNAs beobachtet werden. Frühere, metabolische Studien hatten beschrieben, dass die zelluläre Transkription im Rahmen des Virus-induzierten *host shutoff* durch eine OPV-Infektion fast vollständig eliminiert wird (20, 143, 158, 169). Neuere *Microarray*-basierte Studien zeigen hingegen einen geringeren Einfluss einer Infektion auf die zelluläre Transkription (33, 80, 81, 174). Das Ausmaß des *host shutoffs* ist vermutlich abhängig vom verwendeten Virus bzw. Virus-Stamm und insbesondere vom verwendeten Zelltyp. So konnten Rubins *et al.* in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, keine generelle Reduktion zellulärer mRNAs nach MPXV- oder VACV-Infektion von HeLa Zellen nachweisen (174). Hingegen trat in infizierten Fibroblasten eine deutliche Reduktion zellulärer mRNAs auf (174). Weiterhin ist bei der Bewertung der

Genexpressionsdaten zu berücksichtigen, dass in dieser Arbeit nur zelluläre Transkripte und keine viralen mRNAs quantifiziert wurden. Daher würde eine umfassende Verschiebung hin zu einer geringeren Expression zellulärer mRNAs und einer höheren Expression viraler mRNAs, bei gleicher Gesamt-RNA-Menge, im *Microarray* vermutlich nicht detektiert werden.

Neben der Manipulation der Transkription ist weiterhin zu beachten, dass auch eine Inhibierung der Translation zellulärer mRNAs durch die Bildung kurzer polyadenylierter RNAs in OPV-infizierten Zellen beschrieben wurde (37, 128). Allerdings bleibt der Großteil des zellulären Proteoms aufgrund der vergleichbar langen Halbwertszeit zellulärer Proteine und des kurzen Replikationszyklus der OPV während der Infektion stabil, unabhängig von allen viralen Mechanismen zur Manipulation der zellulären Transkription oder Translation (45).

**Der Einfluss der Infektion auf die zelluläre Genexpression äußerte sich vornehmlich in einer Hochregulierung einiger zellulärer Gene.** In früheren *Microarray*-Studien wurde hingegen beschrieben, dass mehr als 60 % der zellulären Gene, welche überhaupt in Folge einer OPV-Infektion reguliert werden, im Zuge der Infektion reprimiert werden (3, 80, 81). Allerdings tritt diese Herunterregulierung zellulärer Gene überwiegend zu späteren Zeitpunkten der Infektion auf, während insbesondere in den ersten 6 h der Infektion auch zelluläre Gene induziert werden (80, 81). Es ist daher nicht auszuschließen, dass nach dem, in dieser Arbeit gewählten, Zeitpunkt von 6 h p.i. noch eine Verschiebung hin zu einer stärkeren Herunterregulierung zellulärer Gene eintreten würde. Auch der gewählte Schwellenwert ( $\geq$  zweifach reguliert) könnte dazu beitragen, eine milde Herunterregulierung zellulärer Gene zu überdecken, setzt aber den Fokus auf stärker regulierte Gene und besser belastbare Daten. Weiterhin wird angenommen, dass die Herunterregulierung zellulärer Gene in Folge der Infektion unspezifisch erfolgt, während die induzierten Gene vermutlich eine wichtige Rolle bei der Virusreplikation bzw. bei antiviralen Mechanismen der Wirtszelle spielen (33, 80, 116). Daher sind insbesondere die induzierten Gene für einen Vergleich der spezifischen Manipulation der Wirtszelle durch VACV, CPXV und MPXV von Interesse.

#### **4.2 Gemeinsamkeiten bei der Regulation zellulärer Gene**

Die infektionsbedingten Veränderungen der zellulären Genexpression nach VACV-, CPXV- und MPXV-Infektion wiesen große Unterschiede zueinander auf. Dennoch konnten auch einige Transkripte identifiziert werden, welche nach Infektion mit jedem der drei OPV in



ähnlicher Weise reguliert wurden. Signifikant überrepräsentiert war insbesondere eine Gruppe von Transkripten, welche Proteine der Histon-Familie kodieren. Eine auffällige Induktion von Histon-Genen nach OPV-Infektion wurde zuvor schon von mehreren Studien beschrieben (3, 80, 129, 174, 223). Hierbei handelt es sich jedoch vermutlich um ein experimentelles Artefakt, bedingt durch die *de novo* Polyadenylierung zellulärer Histon-mRNAs durch die virale Poly(A) Polymerase (33, 174). Histon-mRNAs sind als einzige eukaryotische mRNAs in der Regel nicht polyadenyliert und daher der poly(A) abhängigen Amplifikationsprozedur nicht zugänglich. *De novo* Polyadenylierung in infizierten Proben würde daher die anschließende Amplifikation und Detektion von Histon-mRNAs im *Microarray* stark begünstigen. Dies wird durch die Ergebnisse von Yang *et al.* gestützt, welche eine Überrepräsentation von Histon-mRNAs 4 h nach VACV-Infektion auch nach poly(A)-spezifischer mRNA-Isolierung beobachten konnten (223). Histon-mRNAs wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen.

**Nur 87 zelluläre Transkripte wurden in ähnlicher Weise durch Infektion mit VACV, CPXV und MPXV reguliert.** Dabei konnte eine signifikante Überrepräsentation von Komponenten des MAPK- und des ErbB-Signalwegs identifiziert werden (Daten nicht gezeigt; siehe auch: Bourquain D., Dabrowski W. Nitsche A., 2012 (23)). Dieser Effekt lässt sich vermutlich mit der Expression viraler *epidermal growth factor* (EGF) Homologe erklären, die von allen OPV kodiert werden (181). Diese stimulieren den ErbB- und den MAPK-Signalweg. Obwohl die Modulation des MAPK-Signalwegs ein genereller Effekt einer OPV-Infektion zu sein scheint, unterscheidet sich die Bedeutung für die virale Replikation zwischen einzelnen OPV. Silva *et al.* zeigten, dass die Inhibierung eines MAPK-Signalwegs in einer signifikanten Verschlechterung der VACV-Replikation resultierte, aber keinen Einfluss auf die CPXV-Replikation hatte (57, 186, 196). Die Bedeutung des MAPK-Signalwegs im Kontext der MPXV-Replikation wurde bisher nicht beschrieben.

#### 4.3 Unterschiedliche Regulation immunbiologisch-relevanter Gene

Neben den wenigen einheitlich regulierten Transkripten zeigten sich große Unterschiede in der Regulierung der zellulären Genexpression nach VACV-, CPXV- oder MPXV-Infektion. Auffällig war insbesondere eine signifikante Induktion mehrerer immunbiologisch relevanter Gene, nach CPXV- oder MPXV-Infektion, nicht jedoch nach VACV-Infektion. Hierbei handelte es sich insbesondere um Gene, welche pro-inflammatorische Cytokine und Chemokine kodieren. Diese sind im Überblick in Tabelle 25 aufgeführt. Es ist jeweils

angegeben, ob die Induktion nur auf mRNA Ebene, im *Microarray* bzw. in der qPCR, beschrieben wurde, oder ob auch eine erhöhte Protein-Sekretion beobachtet wurde. In den Fällen, wo eine Induktion nur auf mRNA-, nicht jedoch auf Proteinebene detektiert wurde, könnte eine spezifische Hemmung durch virale Immunmodulatoren erfolgt sein. Dies wird im Folgenden diskutiert.

**Tabelle 25: Überblick über CPXV- bzw. MPXV-induzierte Cytokine**

Gen	Protein	Induziert nach CPXV- / MPXV-Infektion		
		Microarray	qPCR	Proteinsekretion*
<i>CCL2</i>	CCL2 (MCP-1)	ja	n.d.	ja
<i>CCL20</i>	CCL20	ja	ja	n.d.
<i>CSF2</i>	CSF2 (GM-CSF)	ja	ja	nein
<i>CXCL1</i>	C-X-C motif chemokine 1 (GRO- $\alpha$ )	ja	ja	ja
<i>CXCL2</i>	C-X-C motif chemokine 2 (GRO- $\beta$ )	ja	ja	n.d.
<i>CXCL3</i>	C-X-C motif chemokine 3 (GRO- $\gamma$ )	ja	ja	n.d.
<i>IL1A</i>	IL-1 $\alpha$	ja	ja	nein
<i>IL1B</i>	IL-1 $\beta$	ja	ja	nein
<i>IL6</i>	IL-6	ja	ja	ja
<i>IL8</i>	IL-8	ja	ja	ja

n.d. = nicht durchgeführt

\*Aufgrund sicherheitstechnischer Einschränkungen konnte die Induktion von Cytokinen auf Proteinebene bisher nur für VACV und CPXV (Risikogruppe 2) und nicht für MPXV (Risikogruppe 3) verifiziert werden.

**Die transkriptionelle Hochregulierung pro-inflammatorischer Cytokin-Gene und Chemokin-Gene** könnte ein Anzeichen einer unzureichenden Immunevasion durch CPXV und MPXV, im Vergleich zu VACV, in humanen Zellen darstellen. Die Erkennung einer OPV-Infektion durch die Zelle basiert auf der Detektion sogenannter *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) über *pattern-recognition receptors* (PRRs), welche als Teil der angeborenen Immunität von den meisten Körperzellen exprimiert werden (109). Bereits an der Zelloberfläche kann eine Erkennung der Viruspartikel über bestimmte PRRs erfolgen. Im Fall von VACV wurde eine Detektion durch die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) TLR-2 (225) und TLR-4 (97) beschrieben (siehe auch Abbildung 31). Weiterhin stellen Nukleinsäuren PAMPs dar. Sie können bereits während des *Entry* Vorgangs, insbesondere über TLR-3 (96) und TLR-8 (130), in den Endosomen detektiert werden. Auch im Zytoplasma finden sich verschiedene Sensoren zur Detektion von Fremd-DNA (164). Die Erkennung durch die genannten Mechanismen des angeborenen Immunsystems resultiert in der Regel in einer Induktion pro-inflammatorischer Cytokine durch die Aktivierung des *nuclear factor  $\kappa$  B*-(NF $\kappa$ B-)Signalwegs und einer Induktion von Typ-I Interferonen (IFNs) (164). Weiterhin vermitteln zytoplasmatische DNA-Sensoren die Aktivierung von Caspase-1, welche wiederum die pro-inflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 aktiviert (164). Eine Erkennung von CPXV

oder MPXV über die beschriebenen Mechanismen könnte daher die Induktion pro-inflammatorischer Cytokine als Reaktion auf die Infektion erklären.

**Hingegen konnte keine signifikante Induktion von IFN-Transkripten nach Infektion mit VACV, CPXV oder MPXV identifiziert werden.** Dies wäre bei einer Erkennung einer CPXV- oder MPXV-Infektion über die genannten Mechanismen der angeborenen Immunität ebenfalls zu erwarten gewesen. IFNs zählen zu den bedeutendsten Aktivatoren der angeborenen Immunantwort und können die Virusverbreitung durch die Induktion antiviraler Proteine direkt hemmen (160). Insbesondere IFN- $\alpha$  und - $\beta$  werden von fast allen Zelltypen als Reaktion auf eine Virusinfektion produziert. Allerdings nutzen OPV verschiedene Strategien, um eine Aktivierung der INF-Antwort zu inhibieren. Hierzu zählen unter anderem die Bindung und Sequestrierung von dsRNA, welche ansonsten durch den TLR-3 detektiert wird, über das virale E3L Protein und die direkte Inhibierung von INF-induzierenden Signalwegen (4, 160, 181). Weiterhin exprimieren OPV Bindeproteine für Typ-I und -II IFNs und INF-induzierte Cytokine (4). Es lässt sich daher vermuten, dass sowohl CPXV, als auch VACV und MPXV, in der Lage sind, die IFN-Antwort humaner Zellen zu unterdrücken.

Auch einer Induktion pro-inflammatorischer Cytokine können OPV auf verschiedenen Ebenen entgegenwirken (181). So wird insbesondere der NF $\kappa$ B-Signalweg, welcher die Expression von Cytokinen reguliert, durch akzessorische Proteine der OPV inhibiert (141). Die beobachtete Induktion pro-inflammatorischer Cytokine und Chemokine in CPXV- und MPXV-infizierten Zellen könnte demzufolge auf eine unzureichende Inhibierung dieses Signalwegs oder ähnlicher Mechanismen in den untersuchten humanen Zellen durch CPXV und MPXV, im Vergleich zu VACV, hindeuten. Eine Untersuchung der Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs durch CPXV und MPXV in humanen Zellen könnte daher aufschlussreich sein.

Frühere Studien zeigten allerdings, dass sowohl CPXV, als auch VACV die Aktivierung von NF $\kappa$ B in humanen Zellen (HEK 293) inhibieren können (156). Lediglich Infektion mit dem attenuierten *modified vaccinia Ankara virus* (MVA) induzierte die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs. Neben NF $\kappa$ B könnte aber auch die unzureichende Inhibierung anderer Signalwege, wie z.B. des p38-MAPK-Signalwegs zur Induktion von Cytokin-Genen durch CPXV und MPXV beitragen (116, 147). Unabhängig von der Transkription wird die Aktivität von Cytokinen aber auch auf weiteren Ebenen durch OPV reguliert, welche im Folgenden diskutiert werden.

#### 4.4 Regulation von Cytokinen und Chemokinen

Eine Induktion der Genexpression von *IL1A* und *IL1B* konnte zwar auf mRNA Ebene nach CPXV-Infektion festgestellt werden. Dies resultierte aber nicht in einer gesteigerten Sekretion von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in den Zellkulturüberstand. Im Fall von IL-1 $\beta$  könnte diese Diskrepanz zwischen erhöhter mRNA Expression und gleichbleibend schwacher Proteinsekretion auf der Expression des viralen Caspase-1-Inhibitors CrmA/SPI-2 beruhen, welcher sowohl von CPXV, als auch von VACV kodiert wird. Das CrmA/SPI-2 Protein verhindert die Bildung und Sekretion von aktivem IL-1 $\beta$ , welches durch Caspase-1-vermittelte Spaltung des IL-1 $\beta$  Vorläufers gebildet wird (165, 181). Weiterhin kodieren sowohl CPXV, als auch VACV IL-1 $\beta$  Bindeproteine, welche sekretiertes IL-1 $\beta$  sequestrieren (1, 181, 198). Eine Hochregulierung der *IL1B* mRNA Expression nach CPXV-Infektion bleibt daher vermutlich bedeutungslos. Ob OPV auch mit der Produktion von IL-1 $\alpha$  interferieren ist nicht bekannt. Allerdings konnte auch im Fall von IL-1 $\alpha$  keine gesteigerte Proteinsekretion festgestellt werden, was auf eine posttranskriptionelle Inhibierung hindeutet.

Auch für *CSF2* wurde eine starke Induktion der mRNA-Expression nach CPXV-Infektion beobachtet. Auf Protein-Ebene konnte hingegen eine vergleichbar starke CSF2 Expression in nicht-infizierten und in CPXV-infizierten Zellen nachgewiesen werden, während diese in VACV-infizierten Zellen signifikant niedriger war. Eine direkte Inhibierung von CSF2 ist allerdings nur bei Parapockenviren bekannt und wurde bei OPV bisher nicht beschrieben (181). Die geringere CSF2 Sekretion nach VACV-Infektion könnte auf der Induktion von IL-10 durch VACV beruhen (s. Anhang). Für IL-10 ist bekannt, dass es die Sekretion von CSF2 inhibieren kann (155, 203).

Im Fall von *CCL2* konnte hingegen, im Einklang mit der erhöhten mRNA Expression nach CPXV- oder MPXV-Infektion, auch eine leicht erhöhte Sekretion des CCL2 Proteins nach CPXV-Infektion beobachtet werden. Auffällig war hier, dass die CCL2 Sekretion nach VACV-Infektion auch im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen noch deutlich reduziert war. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde in einer früheren Studie gezeigt, dass die CCL2 Expression *in vivo* in der Maus zwar durch Infektion mit dem attenuierten MVA induziert wird, nicht hingegen durch andere VACV Stämme (118). Die CCL2 Expression war hierbei vermutlich entscheidend für die Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge nach intranasaler MVA-Infektion. Im Fall von CPXV und MPXV ist aber bezüglich der Funktion von sekretiertem CCL2 auch eine mögliche Inhibierung durch den Pan-Chemokin-Inhibitor vCCI zu berücksichtigen (35, 191). Der Chemokin-Inhibitor vCCI wird von allen OPV

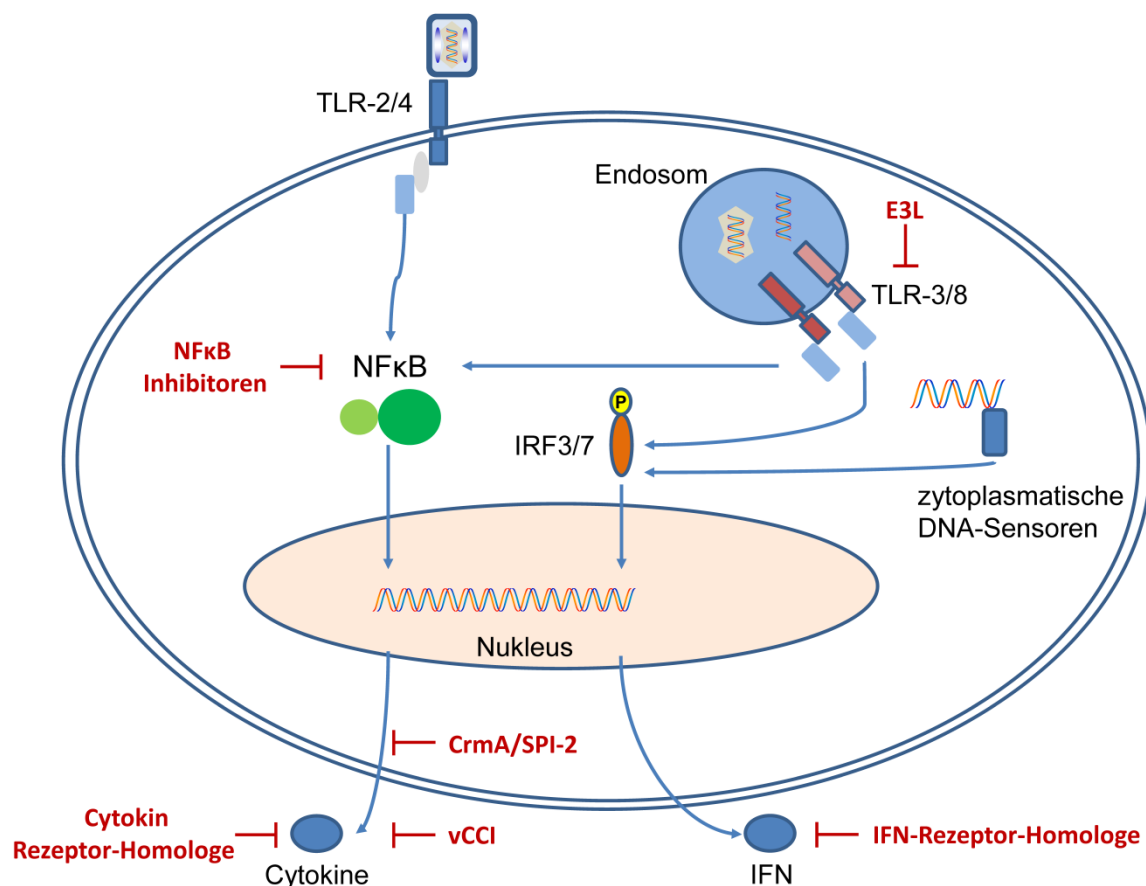
exprimiert (4). Die vCCI Homologe verschiedener OPV sind hoch konserviert (ca. 85 % Identität) und scheinen funktional äquivalent und weisen bezüglich der Chemokin-Bindung vermutlich keine Spezies-Spezifität auf (191). Es ist daher anzunehmen, dass die Neutralisierung von humanem CCL2 durch das vCCI sowohl von VACV und CPXV, als auch von MPXV möglich ist. Die Induktion von CCL2 durch CPXV und MPXV im Vergleich zu VACV bleibt daher eventuell ohne Konsequenzen.

Ähnliches könnte auch für **CCL20** gelten. Eine gesteigerte Genexpression von *CCL20* konnte nach CPXV- und MPXV-Infektion im *Microarray* gezeigt werden. Eine Bestätigung auf Proteinebene steht noch aus. Sekretiertes CCL20 ist insbesondere gegenüber Lymphozyten chemotaktisch aktiv (88). Allerdings ist von einer funktionalen Inhibierung von CCL20 durch vCCI auszugehen, welches CCL20 mit hoher Affinität bindet (4, 35, 191). Auch wurde eine schwache Bindung von CCL20 durch das von CPXV und MPXV kodierte CrmB Protein beschrieben (2, 5), welches somit ebenfalls zur Neutralisierung von CCL20 beitragen könnte.

Unabhängig von der Funktion des vCCI Proteins könnte hingegen die, in der *Microarray*-Analyse identifizierte und mittels qPCR bestätigte, Hochregulierung der **IL6**, **IL8** und **CXCL1** Expression zur Induktion inflammatorischer Prozesse und der Rekrutierung von Leukozyten führen. Eine stark erhöhte Sekretion dieser Proteine durch CPXV-infizierte Zellen konnte zudem unabhängig bei zwei verschiedenen CPXV Stämmen beobachtet werden. Der als Vergleich zum Referenzstamm CPXV BR verwendete Stamm CPXV HumKre08/01 wurde dabei auf Basis einer möglichst großen phylogenetischen Distanz ausgewählt. Die Identität zwischen dem, ursprünglich aus der Hautläsion eines Viehzüchters isolierten und über Meerschweinchen und Kaninchen-Haut passagierten, CPXV BR Stamm (61) und dem, nach Ratte-zu-Mensch Übertragung aus einer Hautläsion isolierten, CPXV HumKre08/01 Stamm beträgt nur 92,8 % auf DNA-Ebene. Beide Viren lassen sich nach neueren Erkenntnissen auch zu unterschiedlichen OPV-Spezies zuordnen, welche traditionell in dem Begriff CPXV zusammengefasst wurden (39). Beide CPXV Stämme induzierten im Gegensatz zu VACV die Sekretion von IL-6, IL-8 und CXCL1/GRO- $\alpha$ . Diese vergleichbare Modulation der Wirtszelle könnte auf einem ähnlichen Repertoire immunmodulatorischer Proteine beruhen, bzw. auf einer ähnlichen Spezies-Adaption dieser Faktoren. Beides kann innerhalb der OPV stark variieren (181). In diesem Fall wäre zukünftig ein Vergleich zum Effekt einer Infektion mit VACV-ähnlichen CPXV Stämmen von Interesse.

Bezüglich der Induktion von IL-6 und IL-8 könnte zudem das virale A39R Protein eine Rolle spielen, welches von verschiedenen OPV kodiert wird, einschließlich VACV und CPXV. Bei

A39R handelt es sich um ein Semaphorin-Homolog, welches die Aggregation von Monozyten und die Bildung von IL-6 und IL-8 induzieren kann (48). In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob die gezielte Induktion bestimmter pro-inflammatorischer Cytokine durch das Virus eine Maßnahme zur Manipulation der Immunantwort und zur Rekrutierung spezifischer Immunzellen darstellt. Ähnliches ist vom murinem Cytomegalovirus bekannt, welches spezifisch die Rekrutierung von Makrophagen induziert, welche produktiv infiziert werden und dann die Verbreitung des Virus im Wirt fördern (175). Eine gesteigerte Expression des *IL6* Gens wurde jedoch auch nach Infektion von HeLa Zellen mit dem attenuierten MVA beobachtet (80), nicht jedoch nach Infektion mit dem virulenten VACV WR (81), was wiederum nahelegt, dass die IL-6 Expression eher ein Zeichen einer unzureichenden Immunevasion darstellt. Ein Modell der beschriebenen Modulation der Cytokin-Expression ist in Abbildung 31 dargestellt.



**Abbildung 31: Modulation der Cytokin- und INF-Sekretion durch OPV.** Virale Immunmodulatoren sind in rot dargestellt. Eine Erkennung der Virusinfektion durch die Zelle kann über TLRs an der Zelloberfläche bzw. in den Endosomen erfolgen, oder über zytoplasmatische DNA-Sensoren. Die aktivierten Signalwege münden in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und IRF3/7, welche die Expression von Cytokinen, bzw. Typ-I IFNs induzieren. Immunmodulatoren der OPV wirken dem auf verschiedenen Ebenen entgegen.

Eine Induktion pro-inflammatorischer Cytokine und Chemokine durch CPXV und MPXV wurde auch in anderen Studien mit verschiedenen Modellsystemen beobachtet. So wurde eine erhöhte *IL8* Genexpression nach MPXV-Infektion von *Maccaca mulata* Nierenepithelzellen (MK2) beobachtet (3). Daher lässt sich vermuten, dass die Induktion von *IL8* durch MPXV unabhängig von der Wirtsspezies stattfindet. Gleichmaßen konnte auch bereits eine starke Sekretion von IL-6, IL-8 und G-CSF *in vivo* nach intrabronchialer Infektion von *Macaca fascicularis* mit MPXV beobachtet werden (102). Im Fall von CPXV wurde zudem eine erhöhte Sekretion von IL-6 und CCL2 (MCP-1) *in vivo* nach intrabronchialer Infektion von *Macaca fascicularis* beobachtet (190). Nach intravenöser Infektion konnten zudem erhöhte Konzentrationen von CCL2, IL-6, IL-8 und IFN- $\gamma$  im Verlauf der Infektion im Blutplasma festgestellt werden (103). Die Bedeutung der gesteigerten IL-6, IL-8 und CCL2 Sekretion im Verlauf einer CPXV- oder MPXV-Infektion, z.B. bei der Rekrutierung von Leukozyten, ist nicht bekannt. Daher wurde in dieser Arbeit die Rekrutierung von Leukozyten durch Zellkulturüberstände von CPXV- und VACV-infizierten Zellen untersucht.

#### 4.5 Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen

Die Chemokine IL-8 und CXCL1/GRO- $\alpha$  sind insbesondere gegenüber neutrophilen Granulozyten chemotaktisch aktiv (12, 180). Das pro-inflammatorische Cytokin IL-6 kann, ähnlich einem klassischen Chemokin, die Rekrutierung von Monozyten bewirken, obwohl es strukturell kein Chemokin darstellt (46). Als Modell für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten wurde die humane Zelllinie HL-60 ausgewählt, welche überwiegend den Phänotyp neutrophiler Promyelozyten abbildet. In der Literatur wurde IL-8 induzierte Chemotaxis von HL-60 Zellen bereits beschrieben (84, 89). Dennoch konnte gegenüber HL-60 Zellen keine erhöhte chemotaktische Aktivität von Zellkulturüberständen CPXV-infizierter Zellen im Vergleich zu Überständen VACV- oder nicht-infizierter Zellen (24 h p.i.) festgestellt werden. Ob die Induktion durch IL-8 und CXCL1/GRO- $\alpha$  nicht ausreichend war, oder die Rekrutierung von HL-60 Zellen durch andere virale Faktoren gehemmt wurde, ist nicht bekannt. Bisher wurde nur für das CPXV CrmB Protein eine Reaktivität zu CXC-Chemokinen wie IL-8 (CXCL8) und CXCL1/GRO- $\alpha$  beschrieben, allerdings zeigt CrmB keine starke Bindung an diese beiden Chemokine (2). Das weitere, noch unbekannte CPXV kodierte Faktoren spezifisch die C-X-C-Chemokin-induzierte Chemotaxis hemmen, ist allerdings nicht auszuschließen.

Im Gegensatz zu HL-60 Zellen zeigten monozytäre U937 Zellen bzw. differenzierte Makrophagen-artige U937 Zellen eine signifikante höhere chemotaktische Aktivität gegenüber Zellkulturüberständen von CPXV-infizierten HeLa Zellen, als gegenüber Überständen von VACV- oder nicht-infizierten Zellen. Chemotaxis von Monozyten könnte in diesem Fall auf der zuvor beschriebenen Sekretion von CCL2 (119) oder IL-6 beruhen (46). *In vivo* stellt IL-6 im Verlauf einer Entzündungsreaktion zudem einen wichtigen Regulator der Umstellung der Immunantwort von neutrophilen Granulozyten hin zu Monozyten dar (107). Auch die Chemokine CXCL1, -2 und -3 tragen *in vivo* zur Rekrutierung von Monozyten zum Ort der Entzündungsreaktion bei (192).

**Fazit:** Auf Basis dieser Daten lässt sich daher vermuten, dass eine CPXV-Infektion *in vivo* unter Umständen eher eine verstärkte Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen, als von neutrophilen Granulozyten zum Infektionsort induzieren könnte (siehe auch: Bourquain D., Nitsche A., 2012 (24)).

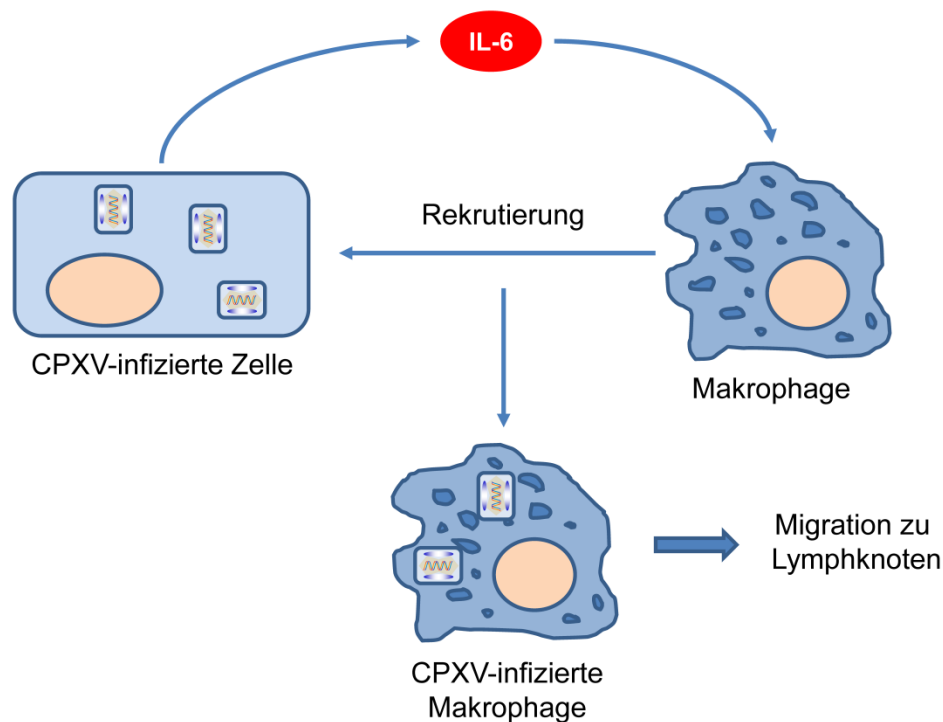
#### 4.6 Makrophagen in der OPV-Infektion

Eine verstärkte Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen im Rahmen einer CPXV-Infektion (und möglicherweise auch nach einer MPXV-Infektion) könnte als Teil der Immunantwort die Virusinfektion begrenzen (143). Dies würde auf eine unzureichende Immunevasion durch CPXV schließen lassen. Alternativ könnte die Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen aber auch einen, der Virusinfektion förderlichen Vorgang darstellen. Letzteres könnte auf Basis der zuvor beschriebenen ähnlichen Mechanismen beim murinen Cytomegalovirus, und aufgrund der bedeutenden Rolle vermutet werden, welche infizierten Leukozyten und insbesondere Monozyten und Makrophagen vermutlich bei der Verbreitung einer OPV-Infektion zukommt (174). So wird angenommen, dass im Rahmen einer VARV-Infektion, die Virusreplikation in Makrophagen, welche die Viruspartikel initial aufnehmen und zu lokalen Lymphknoten transportieren, entscheidend für die Verbreitung des Virus im Organismus ist (214). Das Modell einer möglicherweise vorteilhaften Rekrutierung von Makrophagen durch CPXV ist in Abbildung 32 dargestellt.

Zur Beantwortung dieser Frage sollte insbesondere das Potential von OPV zur Replikation in Monozyten bzw. Makrophagen am Beispiel von CPXV und VACV untersucht werden. Frühere Berichte zeigten bereits, dass VACV cytopathische Effekte (CPEs) in humanen Leukozyten auslöst und nur in Mitogen-stimulierten Zellpopulationen replikationskompetent war (139, 152). Dies deutet auf aktive Zellreplikation als Voraussetzung für die



Virusreplikation hin, wohingegen Makrophagen ausdifferenzierte, sich kaum mehr teilende Zellen darstellen. Weiterhin wurde beschrieben, dass VACV-Infektionen von dendritischen Zellen und Monozyten oder Makrophagen in der Regel abortiv verlaufen (28, 34, 63, 100) und dass dendritische Zellen und Makrophagen nach Infektion häufig durch den apoptotischen Zelltod zugrunde gehen (63, 95). Dies deutet darauf hin, dass VACV scheinbar nicht das Potential zur Replikation in Makrophagen besitzen. Zur Replikationskompetenz von CPXV in Makrophagen ist hingegen wenig bekannt. Frühere Studien legen allerdings nahe, dass eine produktive Replikation von CPXV in Makrophagen stattfinden kann (172).



**Abbildung 32: Modell der Verbreitung von CPXV über infizierte Makrophagen.** Makrophagen werden durch sekretierte Faktoren, wie z.B. IL-6 zum Ort einer CPXV-Infektion rekrutiert. Die Makrophagen nehmen CPXV auf und werden infiziert. Infizierte Makrophagen transportieren CPXV zu den Lymphknoten und verbreiten die Infektion.

Für die OPV ist eine Reihe sogenannter *host range* Proteine beschrieben worden, welche essentiell für die Virusreplikation in definierten Zelltypen bzw. Zellen einer bestimmten Spezies sind (133, 217). Das *host range* Protein p28 wurde als essentieller Faktor beschrieben, welcher die Replikation von ECTV in murinen Makrophagen ermöglicht (183). Das p28 Protein ist innerhalb der OPV stark konserviert und wird unter anderem von VARV, MPXV und auch CPXV exprimiert. Eine Ausnahme stellen die meisten VACV Stämme dar, welche in der Regel stark verkürzte p28 Homologe kodieren. In früheren Studien, welche die abortive Replikation von VACV in Makrophagen untersucht haben, wurden jedoch ebendiese VACV Stämme verwendet, welche kein vollständiges p28 Protein exprimieren (95). Es wurde

daher in dieser Arbeit zunächst die Infektion von Makrophagen mit verschiedenen VACV Stämmen untersucht. Dabei wurde der p28-kodierende VACV Stamm IHD-W mit den VACV-Stämmen WR und LE verglichen, die beide trunkierte Varianten des p28 Proteins kodieren. Es konnte nur im Fall einer Infektion mit dem VACV Stamm IHD-W ein deutlicher CPE in den, als Modell für Makrophagen verwendeten, J774A.1 Zellen beobachtet werden. Daher lässt sich vermuten, dass das p28 Protein auch für die Replikation von VACV in Makrophagen essentiell ist. Allerdings sind hier zukünftig weitere Experimente unter Verwendung spezifischer Virusmutanten oder heterologer Expression von p28 zur Verifizierung erforderlich.

#### 4.7 Die Bedeutung des p28 Proteins für CPXV

Im Gegensatz zu VACV kodieren alle bekannten CPXV Stämme das p28 Protein. Zur weiteren Untersuchung der Replikation von CPXV in Makrophagen und der Rolle des p28 Proteins wurden daher, ausgehend von einem BAC des CPXV BR Genoms (zur Verfügung gestellt von Dr. B. K. Tischer), verschiedene CPXV mit mutiertem p28 Gen konstruiert. Zur Replikation des BACs in *E. coli* wurde eine *mini-F* Vektorsequenz in den Thymidinkinase-(TK-)Lokus des CPXV BR Genoms integriert. Alle aus dem BAC erzeugten Viren sind daher TK-negativ. Unabhängig davon zeigen aus dem BAC erstellte CPXV eine vergleichbare *in vitro* Replikation wie das parentale Wildtyp-CPXV (173). Weiterhin wurde ein GFP ORF unter der Kontrolle des CPXV *late* Promotors p4B inseriert. Das GFP wird daher erst synthetisiert, wenn der Replikationszyklus in die späte Phase eintritt, sodass die GFP-Fluoreszenz als Zeichen der Virusreplikation dienen konnte (173). Zur initialen Untersuchung der Bedeutung des p28 Proteins wurde ein vollständiger *knockout* des p28 Gens durch Mutation des Startcodons eingefügt. Ausgehend von dieser Mutante konnte eine essentielle Funktion des p28 Proteins für die Replikation von CPXV in verschiedenen Monozyten- oder Makrophagen-artigen Zelllinien gezeigt werden. Hierbei wurde die Zunahme viraler Genomkopien als Maß für die Virusreplikation ausgewählt. Im Rahmen einer ECTV-Infektion wird p28 für die Replikation der Virus-DNA in Makrophagen benötigt (183). Es wurde daher davon ausgegangen, dass sich ein Replikationsdefekt der  $\Delta$ p28-CPXV bereits auf Ebene der Genomreplikation manifestiert, und nicht erst in späteren Phasen des Replikationszyklus.

Der p28-abhängige Replikationsdefekt der  $\Delta$ p28-CPXV war spezifisch für Monozyten und Makrophagen und konnte nicht in diversen anderen Zelllinien verschiedenen Ursprungs identifiziert werden. Dies ist in Übereinstimmung mit den, zuvor für ECTV beschriebenen,

Effekten einer p28-Deletion (183). Innerhalb der getesteten Zelllinien war die p28-abhängige Replikation insbesondere in der murinen Makrophagen-Zelllinie J774A.1 zu beobachten. Da Makrophagen in verschiedenen Aktivierungs-Zuständen vorliegen können (153), wurden zudem PMA-stimulierte J774A.1 Zellen getestet. PMA stimuliert die Differenzierung von Monozyten zu einem Makrophagen-ähnlichen Phänotyp (52) und aktiviert Makrophagen, was eine gesteigerte Phagozytose-Aktivität und  $O_2^-$ -Produktion nach sich zieht (110). Frühere Studien hatten einen Replikationsdefekt von  $\Delta$ p28-ECTV in ruhenden Makrophagen beschrieben (183). Dies konnte hier für  $\Delta$ p28-CPXV auch in aktivierten J774A.1 Zellen gezeigt werden. Die essentielle Bedeutung von p28 für die Replikation in Makrophagen scheint demzufolge unabhängig vom Aktivierungszustand der Makrophagen zu sein. Dies sollte zukünftig aber noch in unterschiedlich aktivierten, primären Makrophagen bestätigt werden.

Der p28-abhängige Replikationsdefekt trat allerdings nicht in allen getesteten Makrophagen-Zelllinien auf. Eine mögliche Erklärung könnte der Verlust bestimmter, Makrophagen-spezifischer Charakteristika bei den getesteten, etablierten Zelllinien sein. Diese Überlegung wird dadurch gestützt, dass in allen getesteten primären Makrophagen, bzw. auf Makrophagen, welche aus primären Zellen erhalten wurden, p28 essentiell für die Replikation von CPXV war.

Im Fall von  $\Delta$ p28-ECTV wurde der *host range* Defekt in primären peritonealen Makrophagen der Maus gezeigt (183). Die Maus stellt den natürlichen Wirt von ECTV dar und Infektionen in empfänglichen Maus-Stämmen gehen mit einer hohen Mortalität einher (67). Aufgrund der aufgezeigten Bedeutung von Makrophagen für die OPV-Dissemination im Wirt wird vermutet, dass der *host range* Defekt in Makrophagen den Grund für die Attenuierung von  $\Delta$ p28-ECTV *in vivo* darstellt (182, 183). Im Fall von CPXV wurde unter anderem in der Ratte ein schwerer Verlauf von CPXV-Infektionen beschrieben, welcher oft systemisch ist und durch eine hohe Pathogenität charakterisiert wird (106). Auch hierbei könnte die Fähigkeit zur Replikation in Makrophagen entscheidend zur Verbreitung im Wirt beitragen. Daher wurde die Replikation von CPXV auf primären peritonealen Makrophagen der Ratte untersucht und eine essentielle Bedeutung von p28 gezeigt. In Zukunft wäre daher eine Untersuchung der Pathogenität von  $\Delta$ p28-CPXV in der Ratte, insbesondere im Hinblick auf die Dissemination, von Interesse. Darüber hinaus könnte eine Untersuchung der Pathogenität von  $\Delta$ p28-CPXV in nicht-humanen Primaten weitere Rückschlüsse auf die Bedeutung des p28 Proteins für die Pathogenität von OPV im Menschen ermöglichen. Insbesondere CPXV-Infektionen von

Makaken wurden bereits als Modellsystem für VARV- oder MPXV-Infektionen des Menschen verwendet (190). Im Menschen sind CPXV, unabhängig von der gezeigten Fähigkeit zur Replikation in humanen Makrophagen, hingegen nur schwach pathogen und CPXV-Infektionen bleiben in der Regel lokal begrenzt (38, 66, 113). Weitere, bisher nicht bekannte, Faktoren scheinen hier eine wichtige Rolle zu spielen.

**Fazit:** Diese Ergebnisse belegen die essentielle Funktion des p28 Proteins bei der Replikation von CPXV in Makrophagen von Nagetieren, wie Ratte und Maus, und in humanen Makrophagen. Die Erweiterung des Wirtsbereichs von CPXV durch p28 scheint somit allein Zelltyp-spezifisch zu sein, und ist scheinbar unabhängig von der Wirtsspezies.

#### 4.8 Die molekulare Funktion des p28 Proteins

Die genaue molekulare Funktionsweise von p28, und die Mechanismen, über die p28 die Replikation von OPV in Makrophagen ermöglicht, sind unbekannt. Im Fall von ECTV-p28 wurde jedoch gezeigt, dass die C-terminale RING-Finger Domäne für die Funktion von p28 als *host range*- bzw. Virulenzfaktor essentiell ist (182, 183). Dies sollte auch für CPXV untersucht werden. Daher wurden, neben dem vollständigen *knockout* des p28 Gens, weiterhin zwei Virusmutanten erstellt, deren Mutationen nur die C-terminale RING-Finger Domäne des p28 Proteins betreffen. Zum einen wurde eine Mutante konstruiert, welche ein trunkiertes p28 Protein kodiert, bei dem der C-Terminus einschließlich RING-Finger Domäne vollständig fehlt (CPXV-tp28-Sac). Diese Variante spiegelt die Länge des trunkierten p28 Proteins von VACV WR wider (210). Weiterhin wurde die Struktur der RING-Finger Domäne durch vier Aminosäuresubstitutionen zerstört, ohne das Protein zu verkürzen (CPXV-mp28-Mod). Die RING-Finger Domäne vermittelt die E3-Ubiquitinligase-Aktivität des p28 Proteins (150), daher sollte diese Fähigkeit bei beiden Mutanten fehlen. Weiterhin ist die beschriebene anti-apoptotische Wirkung des p28 Proteins abhängig vom Vorhandensein der RING-Finger Domäne (26).

Das p28 Protein verfügt, neben der RING-Finger Domäne, noch eine über eine N-terminale KILAN Domäne, die vermutlich ein konserviertes DNA-bindendes Motiv darstellt (99). Die KILAN Domäne spielt möglicherweise bei der Lokalisierung des Proteins in den Virusfabriken eine Rolle, welche unabhängig vom Vorhandensein der RING-Finger Domäne erfolgt (150, 183). Die KILAN Domäne blieb bei beiden Mutanten unverändert erhalten.

Unter Verwendung dieser Mutanten konnte gezeigt werden, dass die C-terminale RING-Finger Domäne und somit vermutlich die Ubiquitinligase-Aktivität des p28 Proteins essentiell

für die Replikation von CPXV im Makrophagen ist. Dies wurde sowohl in J774A.1 Zellen, als auch in primären peritonealen Makrophagen der Ratte gezeigt. Alle Mutanten zeigten eine signifikant verringerte DNA-Replikation im Vergleich zu p28-exprimierenden CPXV. Dies resultierte auch in einer signifikant niedrigeren Freisetzung von Nachkommenviren durch infizierte J774A.1 Zellen. Im Gegensatz zu primären Makrophagen war der Replikationsdefekt der Mutante mit modifizierter RING-Finger Domäne (CPXV-mp28-Mod) in J774A.1 Zellen jedoch schwächer ausgeprägt als bei der vollständigen *knockout* Mutante (CPXV-Δp28-Bln) oder der Mutante mit trunkiertem p28 (CPXV-tp28-Sac). Hier ist zu untersuchen, ob das mutierte mp28 noch teilweise über Ubiquitinligase-Aktivität verfügt, oder ob es unabhängig von der RING-Finger Domäne eine eingeschränkte Funktionalität besitzt.

#### 4.9 Die anti-apoptotische Aktivität des p28 Proteins

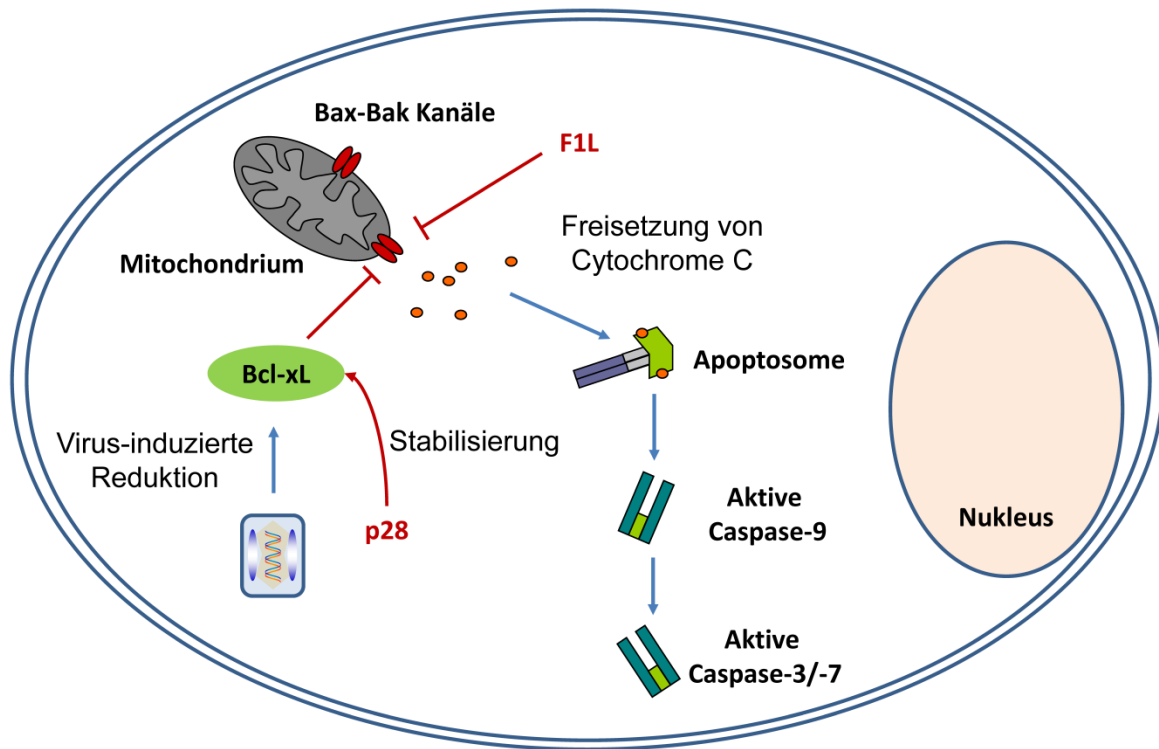
Für weitere Studien zur Funktion von p28 wurde die CPXV-Δp28-Bln *knockout* Mutante verwendet. Es sollte zunächst die beschriebene anti-apoptotische Aktivität des p28 Proteins im Rahmen einer CPXV-Infektion bestätigt bzw. untersucht werden. Weiterhin sollte die Bedeutung für die Funktion von p28 als *host range*- bzw. Virulenzfaktor untersucht werden. Frühere Studien hatten gezeigt, dass Infektion von BGMK-Zellen mit einem VACV, welches kein p28 kodiert, in der späten Phase der Infektion (nach 24 h p.i.) Apoptose induziert. Dieser Effekt konnte durch Überexpression des p28-Orthologs (gp143R) des Shope Fibroma Virus (SFV) reduziert werden (27). Allerdings weisen das p28 Protein der CPXV (und anderer OPV) und das orthologe Protein des SFV (ein Leporipoxvirus) auf Aminosäureebene nur ca. 24,2 % Identität auf. Funktionale Unterschiede sind daher nicht auszuschließen. Zudem ist fraglich, ob die Reduktion spät erfolgender Apoptose infizierter Zellen von Bedeutung ist. Zu diesem Zeitpunkt wäre der Replikationszyklus der OPV bereits abgeschlossen (143). Allerdings wurde dieser Effekt bisher nicht in Makrophagen untersucht. Das p28 in infizierten Makrophagen die Unterbrechung des viralen Replikationszyklus durch früh einsetzende Apoptose verhindert, war daher nicht auszuschließen. Weiterhin ist bekannt, dass p28 in VACV- oder ECTV-infizierten HeLa Zellen für die Inhibierung UV-induzierter Apoptose von Bedeutung ist (26). Da p28 keinen Einfluss auf eine Apoptose-Induktion durch externe Liganden wie TNF oder FasL hatte, spielt hierbei vermutlich eine Hemmung des intrinsischen Apoptose-Signaltransduktionswegs die entscheidende Rolle (26). Beim intrinsischen Signalweg stimulieren pro-apoptotisch wirkende Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie z.B. die Proteine Bax/Bak und Bad, eine Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren (z.B. Cytochrom c) aus dem mitochondrialen Intermembranraum (202). Diesen pro-apoptotischen Proteinen

wirken anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie z.B. Bcl-2 und Bcl-xL, entgegen (202). Insbesondere in Makrophagen spielt zudem das Bcl-xL Protein eine wichtige Rolle beim Selbstschutz gegenüber der Wirkung toxischer Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), die im Rahmen der Aktivierung von Makrophagen gebildet werden (157). Frühere Untersuchungen hatten zudem gezeigt, dass in VACV-infizierten Makrophagen eine Reduktion des anti-apoptotischen Bcl-xL Proteins auftritt (95). Unter der Prämisse, dass:

- 1) Der Replikationsdefekt von VACV in Makrophagen auf das Fehlen des p28 Proteins zurückzuführen ist
- 2) Dies von einer Reduktion des anti-apoptotischen Bcl-xL Proteins begleitet wird
- 3) Das p28 Protein anti-apoptotisch wirkt

sollte untersucht werden, ob in  $\Delta$ p28-CPXV-infizierten Makrophagen eine Reduktion von Bcl-xL auftritt, bzw. p28 über die Stabilisierung von Bcl-xL der Apoptose infizierter Makrophagen entgegenwirkt und somit die Virus-Replikation in Makrophagen ermöglicht. Tatsächlich konnte eine deutliche Reduktion zellulärer Bcl-xL Expression nach Infektion mit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante gezeigt werden, während diese nach Infektion mit CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR stabil blieben. Die Expression des pro-apoptotischen Bcl-xL-Antagonisten Bax blieb dabei unverändert, sodass die Daten auf einen pro-apoptotischen Stimulus in Abwesenheit von p28 schließen lassen. Im intrinsischen Apoptose-Signalweg sollte dieser Stimulus eine Freisetzung von Cytochrom c in das Zytoplasma und eine anschließende Aktivierung von Caspase-9 herbeiführen, gefolgt von einer proteolytischen Kaskade weiterer Caspase-Aktivierung und schließlich dem Zelltod (202). Allerdings konnte eine Hemmung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs durch Inhibierung von Caspase-9 den Replikationsdefekt der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante nicht ausgleichen. Es zeigte sich zwar eine leichte Steigerung der Virus-DNA-Replikation nach Hemmung von Caspase-9. Dies betraf aber sowohl die Infektion mit der CPXV- $\Delta$ p28-Bln Mutante, als auch Infektion mit der CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR Revertante und war nicht ausreichend, um die Replikationsfähigkeit der Mutante wiederherzustellen. Weiterhin konnte anhand einer Messung der Caspase-Aktivität gezeigt werden, dass die CPXV-Infektion von Makrophagen keine Apoptose induziert. Dies war unabhängig von der Expression des p28 Proteins und der Reduktion des zellulären Bcl-xL Gehalts. Es kann vermutet werden, dass die anti-apoptotische Wirkung weiterer viraler Proteine hierbei, unabhängig von p28, eine Rolle spielt. Beispielsweise kodieren OPV das F1L Protein, welches die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien inhibiert und

somit noch unterhalb von Bcl-xL Apoptose inhibieren kann (201). Hier wäre zukünftig eine Untersuchung der Apoptose-Induktion durch eine  $\Delta p28$  /  $\Delta F1L$  Doppelmutante von Interesse. Abbildung 33 zeigt ein Modell der beschriebenen Vorgänge.



**Abbildung 33: Apoptosemodulation durch OPV.** Das virale p28 Protein wirkt einer Virus-induzierten Reduktion des anti-apoptotischen zellulären Bcl-xL Proteins entgegen. Dies würde ansonsten eine Freisetzung von Cytochrom c über Bax-Bak Kanäle aus den Mitochondrien stimulieren. Die Freisetzung von Cytochrom c bewirkt eine Aktivierung von Caspase-9. Die Aktivierung der Caspase-Kaskade resultiert im apoptotischen Zelltod. Der Freisetzung von Cytochrom c wirken die OPV auch durch das virale F1L Protein entgegen.

**Fazit:** Die Expression des p28 Proteins in CPXV-infizierten Zellen kann vermutlich anti-apoptotisch wirken, da sie zur Stabilisierung des zellulären Bcl-xL Proteins beiträgt. In infizierten Makrophagen konnte aber, auch in Abwesenheit des p28 Proteins, keine Virus-induzierte Apoptose detektiert werden. Virus-induzierte Apoptose scheint daher nicht die Ursache des p28-abhängigen Replikationsdefekts in Makrophagen zu sein. Dies sollte zukünftig aber noch mit primären Makrophagen verifiziert werden.

#### 4.10 Ursachen der frühen Hemmung der Infektion mit $\Delta p28$ -CPXV

Da Apoptose als Ursache der eingeschränkten Replikationsfähigkeit der  $\Delta p28$ -CPXV ausscheidet, wurde der Fortschritt der Virusreplikation in CPXV- $\Delta p28$ -Bln- und CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR-infizierten Zellen näher untersucht. In der FACS-Analyse zeigte sich ein geringerer Anteil GFP-exprimierender Zellen 24 h nach Infektion mit der  $\Delta p28$ -Mutante. Da die GFP-

Expression als Zeichen der späten Phase der viralen Genexpression gelten kann und die Infektion mit einer hohen MOI eine vollständige Infektion aller Zellen sicher stellen sollte, lässt dies auf einen Abbruch bzw. eine Verzögerung der Virusreplikation schließen. Auch die geringere Expression des frühen viralen A33R Proteins und des späten viralen L1R Proteins nach CPXV- $\Delta$ p28-Bln-Infektion im Vergleich zu CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR zeigt an, dass entweder weniger Zellen infiziert wurden, oder die Virusreplikation der  $\Delta$ p28-Mutante in einem geringeren Anteil der infizierten Zellen produktiv verläuft. Eine mögliche Ursache könnte eine Typ-I-INF-vermittelte Hemmung der Proteinsynthese darstellen (160). Allerdings konnte keine Induktion von Typ-I INF Genen, mit Ausnahme von *IFNBI*, als Folge der CPXV-Infektion beobachtet werden. Die Induktion von *IFNBI* trat allerdings nach CPXV- $\Delta$ p28-Bln- und CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR-Infektion in vergleichbarem Maß auf. Zudem verfügen CPXV über zahlreiche Mechanismen zur Hemmung der INF-Antwort (s. 4.3). Eine Induktion von INF-Genen, bzw. des INF-vermittelten antiviralen Status ist somit vermutlich nicht der Grund für den Replikationsdefekt der  $\Delta$ p28-CPXV in Makrophagen.

Ausgehend von der Beobachtung, dass der intrazelluläre Gehalt an Bcl-xL nach Infektion mit CPXV- $\Delta$ p28-Bln reduziert wird, wurde zudem das Cytokinprofil infizierter Zellen untersucht. Es ist bekannt, dass Bcl-xL in Makrophagen nicht nur als anti-apoptotischer Überlebensfaktor, sondern auch als anti-inflammatorischer Faktor wirkt. Eine Reduktion der Bcl-xL Expression in Makrophagen kann daher die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine induzieren (11). Hierfür sind zwei mögliche Mechanismen bekannt:

- 1) Regulation des NALP1-Inflammasoms durch Bcl-xL
- 2) Regulation von p38-MAPK und der c-Jun Kinase durch Bcl-xL

Einen möglichen Mechanismus stellt die **Regulation der Inflammasom-Aktivität durch Bcl-xL** dar (32). Inflammasomen stellen Multi-Proteinkomplexe dar, welche in myeloiden Zellen an der Erkennung von DNA-Virus-Infektionen beteiligt sind und als Plattform für die Aktivierung pro-inflammatorischer Caspasen dienen (164). Das Inflammasom beinhaltet einen Rezeptor, welcher in der Regel zur Familie der *Nod-like* Rezeptoren (NLRs) gehört.

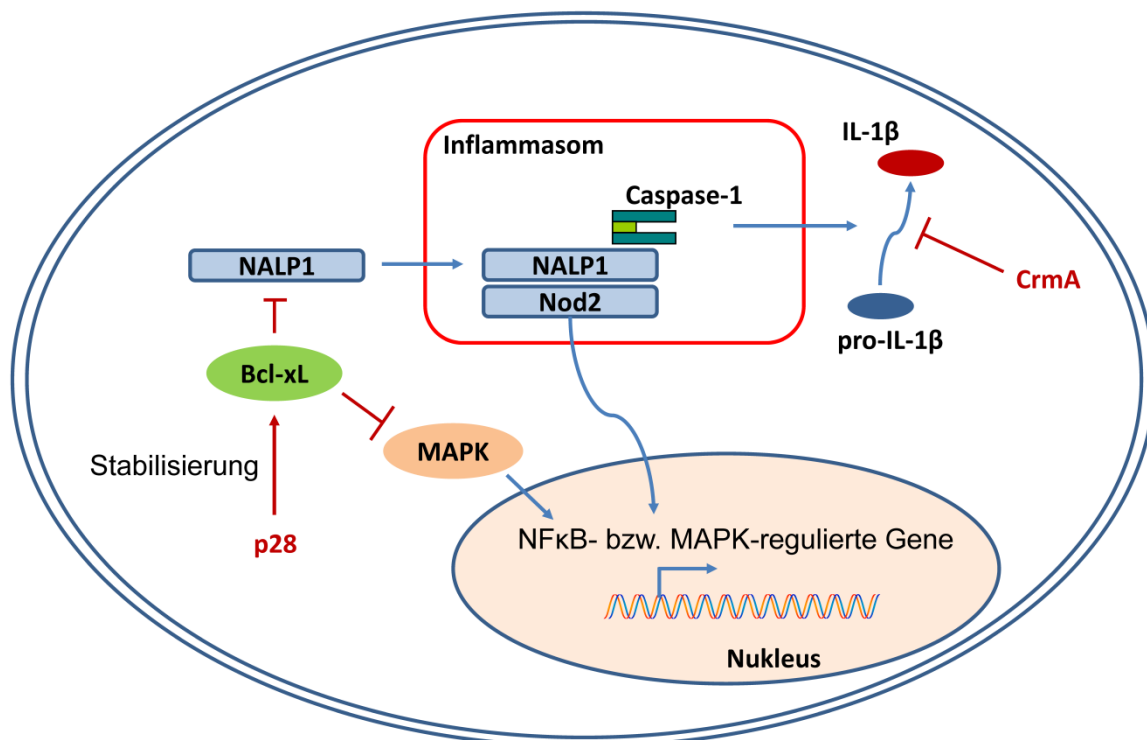
Die NLRs stellen, als Teil des angeborenen Immunsystems, ein intrazelluläres Pendant zu TLRs an der Zelloberfläche dar (131). Bcl-xL hemmt die Aktivierung des NALP1-(*NACHT-LRR-PYD-containing protein-1*)-Inflammasoms. In ruhenden Zellen bindet Bcl-xL an den NLR NALP1 und hemmt die NALP1-vermittelte Aktivierung von Caspase-1 und die daraus



resultierende Produktion von IL-1 $\beta$  und IL-18 (32). In aktivierten Makrophagen wird NALP1 freigegeben und das Inflammasom gebildet (32, 70, 200). Eine Stabilisierung von Bcl-xL durch p28 in infizierten Zellen könnte somit der Aktivität des Inflammasoms entgegenwirken. Die Bcl-xL-vermittelte Inhibierung von NALP1 stellt zudem einen Mechanismus dar, der Apoptose und angeborene Immunität verbindet. Das Inflammasom kann zudem durch UV-Bestrahlung aktiviert werden und den programmierten Zelltod induzieren (149), was eine mögliche Erklärung für die beschriebene anti-apoptotische Aktivität von p28 gegenüber UV-induzierter Apoptose darstellen könnte. Die Bedeutung des Inflammasoms im Rahmen einer OPV-Infektion ist noch unklar, allerdings ist mit dem M013 Protein zumindest bei Leporipoxviren ein Inhibitor des Inflammasoms bekannt, welcher essentiell für die Replikation von Myxomaviren in Monozyten ist (104). Ob ähnliche Strategien bei den OPV existieren, ist noch zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte generell nach Infektion, sowohl mit der  $\Delta$ p28-Mutante, als auch mit der Revertante, eine Induktion verschiedener Cytokine beobachtet werden. IL-1 $\beta$  konnte jedoch in keiner Probe detektiert werden. Selbst im Fall einer verstärkten Aktivierung des NALP1-Inflammasoms und von Caspase-1 in Abwesenheit von p28, wäre hier jedoch noch der zuvor beschriebene Einfluss des viralen CrmA-Proteins auf die Produktion von IL-1 $\beta$  zu berücksichtigen (181). In Übereinstimmung hierzu konnte auch keine gesteigerte Aktivität von Caspase-1 in infizierten Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Funktion des p28 Proteins basiert somit vermutlich nicht auf einer Regulation der Caspase-1-Aktivierung über das Inflammasom. Unterschiede zwischen CPXV- $\Delta$ p28-Bln und CPXV-p28<sup>+</sup>-BlnR zeigten sich vorrangig in einer stärkeren Sekretion der Cytokine IL-6 und sICAM-1 und in geringerem Maße von TREM-1, IL-1ra und TNF- $\alpha$ . Die Expression vieler dieser Cytokine wird über den NF $\kappa$ B- oder MAPK-Signalweg reguliert. Eine Induktion von NF $\kappa$ B-abhängig regulierten Cytokinen wurde aber auch für die Infektion humaner Monozyten mit einem Myxomavirus beschrieben, bei dem der virale Inflammasom-Inhibitor M013 deletiert worden war (163), und könnte demzufolge auf eine Aktivierung zellulärer Inflammasomen zurückzuführen sein. Eine Bcl-xL-abhängige Aktivierung von NF $\kappa$ B könnte durch den NLR Nod2 erfolgen, welcher vermutlich ein Bestandteil des NALP1-Inflammasoms ist und NF $\kappa$ B aktivieren kann (200). Zukünftig sollte daher eine genauere Analyse der Auswirkungen von p28 auf die Aktivität von Inflammasomen bzw. die Inflammasom-vermittelten NF $\kappa$ B-Aktivierung erfolgen.

Unabhängig vom Inflammasom beeinflusst Bcl-xL den Aktivierungszustand von Makrophagen auch durch die Modulation weiterer zellulärer Signalwege. Frühere Studien haben aufgezeigt, dass die anti-inflammatorische Funktion von Bcl-xL insbesondere auf die **Hemmung des p38-MAPK-Signalwegs und der Kinase c-Jun durch Bcl-xL** zurückzuführen ist (114). Eine Reduktion von Bcl-xL in CPXV- $\Delta$ p28-Bln-infizierten Zellen könnte somit auch Inflammasom-unabhängig zu einer Induktion pro-inflammatorischer Cytokine beitragen. Die verschiedenen Möglichkeiten einer Modulation der Makrophagen-Aktivität durch p28 sind im Überblick in Abbildung 34 dargestellt.



**Abbildung 34: Manipulation der Makrophagen-Aktivität durch p28 (Modell).** Das p28 Protein könnte durch Stabilisierung von Bcl-xL die Aktivierung von Makrophagen beeinflussen. Bcl-xL inhibiert die Bildung des NALP1-Inflammasoms, welches Caspase-1 und NFκB aktiviert. Die Caspase-1 Aktivierung wird aber vermutlich durch das virale CrmA Protein ausgeglichen. Bcl-xL inhibiert zudem die MAPK-abhängige Transkription von Cytokin-Genen.

**Fazit:** Es lässt sich bisher festhalten, dass das p28 Protein im Rahmen einer OPV-Infektion vermutlich den Aktivierungszustand OPV-infizierter Makrophagen beeinflusst. Dies spiegelt sich in einer Induktion verschiedener Cytokine und einer Reduktion der Bcl-xL Expression in Abwesenheit von p28 wieder. Noch unklar ist allerdings, ob diese Induktion pro-inflammatorischer Cytokine in CPXV- $\Delta$ p28-Bln-infizierten Makrophagen die Ursache oder eine Folge des Replikationsdefekts der  $\Delta$ p28-Mutante ist. Weiterhin ist noch zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt auf die verringerte Bcl-xL Expression und eine eventuell damit einhergehende Aktivierung des Inflammasoms zurückgeht, bzw. ob die Stabilisierung von

Bcl-xL einen gezielten Effekt des p28 Proteins darstellt. Dass die Inhibierung der Inflammasomen prinzipiell von großer Bedeutung für die Replikation von Pockenviren sein kann, wurde dabei bereits am Beispiel des Myxomavirus gezeigt (104, 163).

#### **4.11 Interaktionspartner des p28 Proteins**

Zur weiteren Klärung der Funktionsweise des p28 Proteins ist insbesondere die Identifizierung zellulärer Interaktionspartner bzw. Substrate für die Ubiquitinligase-Aktivität von Bedeutung. Im Hinblick auf die vorherigen Ergebnisse, sollten hierbei insbesondere die Fragen beantwortet werden, ob:

- 1) p28 mit Proteinen interagiert, welche die Stabilität von Bcl-xL beeinflussen
- 2) p28 direkt mit Bcl-xL interagiert

Hierzu wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet. Im *Y2H Screening* wurden mögliche zelluläre Interaktionspartner des p28 Proteins identifiziert. Diese Interaktionen wurden anschließend im *Pull-down* Test verifiziert. Im *Pull-down* Test wurde die Bindung von Proteinen aus dem Zelllysate von J774A.1 Makrophagen an p28 untersucht. Hierdurch sollte zum einen ausgeschlossen werden, dass es sich bei identifizierten Interaktionen um Artefakte handelt, welche nur in der Hefe auftreten. Zum anderen sollte sichergestellt werden, dass mögliche Interaktionspartner tatsächlich im relevanten Zelltyp, der Makrophage, exprimiert werden. Im *Y2H Screening* konnte eine Interaktion zwischen dem, vom *COPS5* Gen kodierten, SGN5 Protein und p28 festgestellt werden. SGN5 ist ein multifunktionales Protein, welches unter anderem als pro-apoptotischer Faktor agieren kann. Hierbei konkurriert SGN5 mit Bcl-xL um die Bindung des ebenfalls pro-apoptotischen Mitglieds der Bcl-2 Familie BclGs, was die mitochondriale Apoptose fördert (125). Eine mögliche Interaktion zwischen SGN5 und p28 konnte allerdings nicht im *Pull-down* Test bestätigt werden.

Im *Y2H Screening* konnte zudem das vom *UBE2N* Gen kodierte Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 N (Ubc13) als potentieller Interaktionspartner des p28 Proteins identifiziert werden. Dass Ubc13 *in vitro* mit p28 beim Vorgang der Ubiquitinierung zusammenwirken kann, wurde bereits gezeigt (93). Allerdings konnte auch diese Interaktion nicht im *Pull-down* Test bestätigt werden. Möglicherweise ist die Interaktion zwischen der Ubiquitinligase p28 und dem Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc13 beim Vorgang der Ubiquitinierung lediglich transient und war daher in diesem Versuch nicht nachweisbar.

Die im *Y2H Screening* identifizierte Interaktion zwischen p28 und dem zellulären Translations-Initiationsfaktor eIF1b konnte hingegen auch im *Pull-down* Test bestätigt werden. Welche Rolle eIF1b bei der Translations-Initiation spielt, ist allerdings unbekannt. Es stellt ein Homolog des SUI1 Proteins der Hefe dar, welches für die Bindung des GTP/Met-tRNA/eIF2 Komplexes an das 40S Ribosom benötigt wird. Das humane eIF1b Protein interagiert mit zahlreichen Komponenten des eIF3 und eIF2 Komplexes (69). Ob die Interaktion zwischen p28 und eIF1b die Translation der Wirtszelle beeinflusst und somit die Virusreplikation beeinflusst, ist noch zu untersuchen.

Das Bcl-xL Protein selbst wurde nicht als möglicher Interaktionspartner von p28 im *Y2H Screening* identifiziert. Aufgrund der Stabilisierung von Bcl-xL in Gegenwart von p28 wurde jedoch eine mögliche Interaktion im *Pull-down* Test untersucht und konnte hier bestätigt werden. Unklar ist noch, ob diese Interaktion auch in der intakten Zelle stattfindet. Bcl-xL lokalisiert in der Kernmembran und den Membranen der Mitochondrien und des ERs, sowie im Zytoplasma nicht-apoptotischer Zellen (77, 92). Hingegen liegt p28 überwiegend in den Virusfabriken vor (183, 210). Ob Bcl-xL ebenfalls in infizierten Zellen in den Virusfabriken lokalisiert, ist noch unbekannt. Allerdings werden die Virusfabriken von Membranen des rauen ERs umschlossen, in denen auch Bcl-xL vorliegt (205, 218). Eine Interaktion zwischen ER-lokalisiertem Bcl-xL und p28 würde darauf hindeuten, dass diese Interaktion nicht die Manipulation der mitochondrialen Apoptose, sondern eher eine Manipulation der ER-Stress-Antwort zum Ziel hat. Zukünftig sollte daher eine mögliche Ko-Lokalisation von p28 und Bcl-xL in infizierten Zellen untersucht werden. Da Bcl-xL in Gegenwart von p28 stabilisiert wird, ist auszuschließen, dass Bcl-xL durch p28-vermittelte Ubiquitinierung der proteasomalen Degradierung zugeführt wird.

Das *Y2H Screening* weist bei der Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen mehrere Einschränkungen auf, z.B. bei der Identifizierung von Interaktionen mit Membran-gebundenen Proteinen wie Bcl-xL. Durch die Analyse in der Hefe und die Verwendung einer universellen cDNA-Bibliothek besteht zudem ein erhöhtes Risiko, artifizielle oder irrelevante Interaktionen zu identifizieren, z.B. mit Proteinen, welche in Makrophagen nicht exprimiert werden. Daher wurde parallel im *Pull-down* Test in Zelllysaten infizierter oder nicht-infizierter Makrophagen nach zellulären oder viralen Interaktionspartnern des p28 Proteins gesucht. Diese wurden anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert.

Im *Pull-down* Test konnten keine viralen, aber mehrere zelluläre Proteine als mögliche Interaktionspartner des p28 Proteins identifiziert werden. In Bezug auf den zuvor

beschriebenen Effekt des p28 Proteins auf die Expression von Bcl-xL könnte insbesondere die identifizierte Interaktion mit dem Protein Serpin B13 von Interesse sein. Der Serinprotease-Inhibitor Serpin B13 inhibiert Cathepsin L (215), welches wiederum Bcl-xL und andere anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie spalten und Apoptose induzieren kann (62). Dass Serpin B13 UV-induzierten Zelltod in Keratinozyten inhibiert, wurde bereits gezeigt (215). Demzufolge wäre eine Stabilisierung oder funktionale Modifizierung von SERPIN B13 durch p28 zu untersuchen.

Das, ebenfalls als möglicher Interaktionspartner identifizierte, Protein MOB2 ist als Regulator der zellulären Kinasen STK38 und STK38L bekannt (111), welche Funktionen bei der Zell-Proliferation und Apoptose innehaben (85). Eine spezifische Funktion in Makrophagen ist nicht bekannt. Eine mögliche Ubiquitinierung von MOB2 durch p28 ist noch zu untersuchen.

Als weiterer möglicher Interaktionspartner wurde das multifunktionale ID-1 Protein identifiziert, welches an der Regulation des Zellzyklus, des Zelltods, der Differenzierung und anderer zellulärer Prozesse beteiligt ist. Darüber hinaus reguliert ID-1 die Expression mehrerer viraler Proteine, wie die des HBx Proteins des Hepatitis B Virus und des LMP1 Proteins des Epstein Barr Virus, über einen Proteasom-abhängigen Mechanismus (123). Da p28 selbst instabil ist und sowohl durch Auto-Ubiquitinierung, als auch durch einen unbekannten zellulären Faktor der proteasomalen Degradierung zugeführt wird (144), wäre es interessant, eine mögliche Regulation von p28 durch ID-1 zukünftig zu untersuchen.

Bei all diesen möglichen Interaktionspartnern ist eine Verifizierung der Interaktion in der intakten Zelle zukünftig erforderlich. Auch sollte eine Ubiquitinierung dieser Faktoren durch p28 untersucht werden.

#### **4.12 Schlussfolgerung & Ausblick**

Ziel dieser Arbeit war es, die spezifische Interaktion zwischen OPV und ihrer Wirtszelle zu untersuchen. Dies erfolgte am Beispiel von VACV, CPXV und MPXV, welche die bedeutendsten Zoonose-Erreger innerhalb der OPV darstellen. VACV, CPXV und MPXV unterscheiden sich bezüglich ihres Wirtsbereichs und ihrer Pathogenität in verschiedenen Wirtsspezies und in ihrem Repertoire immunmodulatorischer Proteine. Diese Unterschiede spiegeln sich in der Heterogenität der Auswirkungen einer Infektion auf das Genexpressionsprofil humaner Zellen wider.

**Die Infektion humaner Zellen mit CPXV und MPXV induzierte, im Gegensatz zu VACV, eine ausgeprägte pro-inflammatorische Reaktion infizierter Zellen.** Dies zeigte sich insbesondere in einer gesteigerten Expression pro-inflammatorischer Cytokine und Chemokine und könnte eine unzureichende Manipulation zellulärer Mechanismen anzeigen, welche zur Erkennung und Bekämpfung der Infektion dienen. Dies ist überraschend, da insbesondere CPXV ein sehr großes Repertoire immunmodulatorischer Faktoren kodieren (4). Daher lässt sich eine schlechtere Manipulation des Immunsystems durch CPXV, im Vergleich zu VACV, nur durch eine unzureichende Adaption dieser immunmodulatorischer Faktoren an die humane Immunabwehr erklären. **Die Expression pro-inflammatorischer Cytokine und Chemokine durch CPXV-infizierte Zellen resultierte in einer verstärkten Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen.** Insbesondere Makrophagen spielen jedoch auch eine entscheidende Rolle bei der Verbreitung einer OPV-Infektion im Organismus (143, 214). Daher könnte eine Rekrutierung von Makrophagen als bevorzugte Wirtszellen auch eine für das Virus vorteilhafte Reaktion darstellen. Vergleichbares ist auch bei anderen Viren bekannt (175). Voraussetzung für eine Verbreitung der OPV über rekrutierte Makrophagen ist die Replikation der Viren in diesem Zelltyp. **Das virale p28 Protein ist essentiell für die Replikationsfähigkeit von OPV in Makrophagen.** Die meisten VACV kodieren kein p28 und sind vermutlich daher nicht in der Lage, in Makrophagen zu replizieren (34, 95). Die p28-exprimierenden CPXV waren hingegen in Makrophagen von Mensch, Ratte und Maus replikationskompetent. Für MPXV, welche p28 kodieren, ist Ähnliches zu vermuten, der Nachweis steht allerdings noch aus. **Die Replikationsfähigkeit in Makrophagen ist abhängig von der E3 Ubiquitinligase-Aktivität des p28 Proteins, nicht jedoch von der beschriebenen anti-apoptotischen Wirkung (26, 27).** Das p28 Protein könnte jedoch eine Aktivierung infizierter Makrophagen hemmen, worauf die reduzierte Bcl-xL Expression und die erhöhte Cytokine-Sekretion  $\Delta$ p28-CPXV-infizierter Makrophagen hinweist.

Welche Bedeutung Makrophagen im Rahmen einer zoonotischen OPV-Infektion zukommt ist noch weitgehend ungeklärt. Die Rekrutierung von Makrophagen durch CPXV-infizierte humane Zellen und die aufgezeigte Replikationsfähigkeit von CPXV in Makrophagen verschiedener Spezies könnte jedoch auf eine wichtige Funktion bei der Verbreitung der Infektion im Organismus hindeuten. Ähnliches wurde für VARV und ECTV in ihrem jeweiligen natürlichen Wirt beschrieben (143, 182, 183). Eine essentielle Bedeutung der Replikation in Makrophagen für die OPV-Pathogenität würde daher auch auf ein geringeres Risikopotential zoonotischer VACV im Vergleich zu CPXV und MPXV schließen lassen.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich weitere Fragestellungen und Aspekte, die in zukünftigen Projekten bearbeitet werden könnten:

- Untersuchung der Aktivierung zellulärer Signalwege (z.B. TLR, NF $\kappa$ B), welche an der Erkennung und Bekämpfung einer Infektion beteiligt sind, um spezifische Unterschiede in der Manipulation durch die verschiedenen OPV aufzeigen.
- Verifizierung der pro-inflammatorischen Reaktion in weiteren, für die OPV-Infektion relevanten, Zelltypen, wie Makrophagen, dendritische Zellen und Keratinocyten, und in Zellen anderer Spezies.
- Verifizierung der Induktion pro-inflammatorischer Cytokine durch MPXV auf Proteinebene und Untersuchung der Rekrutierung von Leukozyten durch MPXV-infizierte Zellen. (Aufgrund der technischen Ausstattung des hierfür benötigten S3-Labors war dies bisher nicht möglich.)
- Charakterisierung der Induktion einer pro-inflammatorischen Reaktion in humanen Zellen durch verschiedene Virusstämme. Insbesondere ein Vergleich der unterschiedlich-pathogenen CPXV Stämme bzw. Spezies (94) wäre von Interesse, um die Bedeutung für die Pathogenität einer OPV-Infektion besser beurteilen zu können.
- Zur Verifizierung der Bedeutung des p28 Proteins für OPV sollte untersucht werden, ob p28 die Replikationsfähigkeit von VACV in Makrophagen wiederherstellen kann.
- Um die molekulare Funktion des p28 Proteins zu identifizieren, sollte die Modulation zellulärer Signalwege durch p28 untersucht werden, welche bei der Aktivierung von Makrophagen eine Rolle spielen (NF $\kappa$ B, p38-MAPK). Weiterhin sollte untersucht werden, ob es in  $\Delta$ p28-CPXV-infizierten Makrophagen zum Aufbau eines antiviralen Status und der Hemmung der Proteinsynthese kommt, z.B. durch Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 $\alpha$ .
- Um den genauen Funktionsmechanismus von p28 aufzuklären, sollte die Interaktion mit den beschriebenen putativen Interaktionspartnern verifiziert werden, z.B. durch Untersuchung der Ko-Lokalisation in der infizierten Zelle. Auch sollte eine p28-abhängige Ubiquitinierung verifizierter Interaktionspartner untersucht werden, und ob diese dem Abbau über das Proteasom zugeführt werden.
- Zur Klärung der Rolle, welche Makrophagen im Rahmen einer Infektion mit zoonotischen OPV spielen, wäre eine Untersuchung der Pathogenität von  $\Delta$ p28-CPXV im Tier, z.B. in der Ratte, von großem Interesse.

## 5. Abkürzungsverzeichnis

Gebräuchliche Standardabkürzungen und SI-Einheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

A.bidest.	<i>Aqua bidestillatus</i>	MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Ade	Adenin	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>	MID	<i>multiplex identifier</i>
BSA	bovines Serum-Albumin	MOI	<i>multiplicity of infection</i>
BPXV	<i>buffalopox virus</i>	MPXV	<i>monkeypox virus</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>	MS	Massenspektrometer
cDNA	<i>complementary DNA</i>	MV	<i>mature virion</i>
CI	<i>cell index</i>	MVA	<i>modified Vaccinia Ankara virus</i>
CMC	Cethylmethylcellulose	OPV	Orthopockenviren
CPE	cytopathischer Effekt	ORF	<i>open reading frame</i>
CPXV	<i>cowpox virus</i>	PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
Crm	<i>cytokine response modifier</i>	PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
cRNA	<i>complementary RNA</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
cT	<i>threshold cycle</i>	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	PFU	<i>plaque forming units</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	p.i.	<i>post infectionem</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA	PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
DTT	Dithiothreitol	qPCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
ECTV	Ectromelievirus	rfu	<i>relative fluorescence units</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	RIN	<i>RNA integrity</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent Assay</i>	RING	<i>really interesting new gene</i>
EMEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
ER	endoplasmatisches Reticulum	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
EV	<i>extracellular virion</i>	RT	Raumtemperatur
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>	SFV	Shope fibroma virus
FKS	fötales Kälberserum	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
FLICA	<i>fluorescent labeled inhibitor of caspases</i>	TNF	Tumornekrosefaktor
FPXV	<i>fowlpox virus</i>	Trp	Tryptophan
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>	ü.N.	über Nacht
GO	<i>Gene Ontology</i>	VARV	Variola Virus
His	Histidin	VACV	Vaccinia Virus
ICE	<i>interleukin-1 converting enzyme</i>	vCCI	<i>viral CC chemokine inhibitor</i>
IFN	Interferon	VECTOR	<i>State Research Centre for Virology and Biotechnology</i>
IFT	Immunfluoreszenztest	vTNFR	virales TNF-Rezeptor-
IL	Interleukin	WHO	<i>World Health Organization</i>
LB	Luria-Bertani	WT	Homolog
Leu	Leucin	Y2H	Wildtyp
			<i>Yeast-Two-Hybrid</i>



## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Replikationszyklus der OPV .....	5
Abbildung 2: Immunmodulation durch OPV am Beispiel von CPXV .....	11
Abbildung 3: Struktur der RING-Finger Domäne .....	13
Abbildung 4: Vorgang der Ubiquitinierung durch RING-Finger E3-Ubiquitinligasen .....	14
Abbildung 5: BAC-Mutagenese .....	32
Abbildung 6: Infektion von HeLa Zellen .....	47
Abbildung 7: Anzahl induzierter und reprimierter Transkripte nach Infektion .....	48
Abbildung 8: Überschneidungen der Genregulation nach Infektion .....	49
Abbildung 9: Differentielle Regulation von Cytokin-Genen .....	51
Abbildung 10: Differentielle Hoch- oder Herunterregulierung von Cytokin-Genen .....	52
Abbildung 11: Verifizierung der Ergebnisse der <i>Microarray</i> -Analyse in der qPCR .....	53
Abbildung 12: Relative Quantifizierung der Cytokin-Konzentrationen im Überstand von VACV-, CPXV BR-, CPXV HumKre08/01-, oder nicht-infizierten Zellen .....	55
Abbildung 13: Absolute Quantifizierung der Sekretion von IL-6, IL-8 und CXCL1 im Infektionsverlauf .....	56
Abbildung 14: Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen durch Zellkulturüberstände infizierter Zellen ..	57
Abbildung 15: Echtzeit-Analyse von J774A.1 Zellen nach Infektion mit verschiedenen VACV Stämmen .....	58
Abbildung 16: Mutation des p28 Proteins .....	60
Abbildung 17: Genomreplikation von CPXV-Δp28-Bln in J774A.1 Zellen .....	61
Abbildung 18: Genomreplikation von CPXV-Δp28-Bln (A), CPXV-tp28-Sac (B) oder CPXV-mp28-Mod (C) in J774A.1 Zellen .....	63
Abbildung 19: Anzahl infektiöser Partikel im Zellkulturüberstand .....	64
Abbildung 20: Vervielfältigung des Virusgenoms p28-mutierter CPXV im Vergleich zum Wildtyp-Virus in primären peritonealen Makrophagen ( <i>R. norvegicus</i> ) .....	65
Abbildung 21: Vergleich der Genomreplikation von CPXV-Δp28-Bln und CPXV-p28 <sup>+</sup> -BlnR auf M1 Makrophagen aus primären CD14 <sup>+</sup> Monozyten ( <i>H. sapiens</i> ) .....	66
Abbildung 22: Expression von Bcl-xL und Bax nach Infektion von J774A.1 Zellen .....	67
Abbildung 23: Vergleich der Genomreplikation von CPXV-Δp28-Bln und CPXV-p28 <sup>+</sup> -BlnR ± Z-LEHD-fmk ..	68
Abbildung 24: FACS Analyse der Caspase-Aktivität in infizierten J774A.1 Zellen .....	70
Abbildung 25: Expression des frühen viralen A33R und des späten viralen L1R Proteins .....	71
Abbildung 26: Zunahme der <i>IFNB1</i> Genexpression nach Infektion .....	71
Abbildung 27: Cytokin-Sekretion infizierter J774A.1 Zellen .....	73
Abbildung 28: <i>Pull-down</i> Analyse der Interaktion zwischen p28 und eIF1b bzw. Bcl-xL .....	75
Abbildung 29: <i>Pull-down</i> Test .....	76
Abbildung 30: Identifizierung möglicher Interaktionspartner des p28 Proteins mittels <i>Pull-down</i> Test .....	77
Abbildung 31: Modulation der Cytokin- und INF-Sekretion durch OPV .....	86
Abbildung 32: Modell der Verbreitung von CPXV über infizierte Makrophagen .....	89
Abbildung 33: Apoptosemodulation durch OPV .....	95
Abbildung 34: Manipulation der Makrophagen-Aktivität durch p28 (Modell) .....	98
Abbildung 35: Relative Quantifizierung der Cytokin-Konzentrationen im Überstand von VACV-, CPXV BR-, CPXV HumKre08/01-, oder nicht-infizierten Zellen .....	118

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bedeutende Vertreter der <i>Poxviridae</i> (modifiziert nach (98, 140)).	3
Tabelle 2: Humanpathogene Orthopockenviren (modifiziert nach (133)).	9
Tabelle 3: Chemikalien	16
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 5: Geräte	17
Tabelle 6: Bakterienstämme	17
Tabelle 7: Hefestämme	18
Tabelle 8: Humane und tierische Zelllinien	18
Tabelle 9: Viren	19
Tabelle 10: Plasmide	19
Tabelle 11: cDNA Bibliotheken	19
Tabelle 12: Primer und Sonden für die quantitative TaqMan® <i>real-time</i> PCR	20
Tabelle 13: Primer für BAC-Mutagenese und Klonierung	20
Tabelle 14: Primär- und Sekundär-Antikörper und Liganden	21
Tabelle 15: Verwendete Enzyme	21
Tabelle 16: Molekularbiologische Kits	22
Tabelle 17: Kommerziell erhältliche TaqMan® Genexpressions-Tests	22
Tabelle 18: Spezielle Software	24
Tabelle 19: PCR-Zyklen	27
Tabelle 20: TaqMan® <i>real-time</i> PCR-Zyklen	27
Tabelle 21: Konstruierte rekombinante Viren	60
Tabelle 22: Vergleich der Replikationseffizienz von CPXV- $\Delta$ p28-Bln <i>in vitro</i>	62
Tabelle 23: Im <i>Yeast-2-Hybrid Screening</i> identifizierte potentielle p28-Interaktionspartner	74
Tabelle 24: Im <i>Pull-down</i> Test mittels Massenspektrometrie identifizierte p28-Interaktionspartner	76
Tabelle 25: Überblick über CPXV- bzw. MPXV-induzierte Cytokine	82

## 8. Literaturverzeichnis

1. **Alcami A, Smith GL.** 1992. A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* **71**:153-167.
2. **Alejo A, Ruiz-Arguello MB, Ho Y, Smith VP, Saraiva M, Alcami A.** 2006. A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5995-6000.
3. **Alkhalil A, Hammamieh R, Hardick J, Ichou MA, Jett M, Ibrahim S.** 2010. Gene expression profiling of monkeypox virus-infected cells reveals novel interfaces for host-virus interactions. *Virol J* **7**:173.
4. **Alzhanova D, Fruh K.** 2010. Modulation of the host immune response by cowpox virus. *Microbes Infect* **12**:900-909.
5. **Antonets DV, Nepomnyashchikh TS, Shchelkunov SN.** 2010. SECRET domain of variola virus CrmB protein can be a member of poxviral type II chemokine-binding proteins family. *BMC Res Notes* **3**:271.
6. **Arita I.** 2011. Smallpox: should we destroy the last stockpile? *Expert Rev Anti Infect Ther* **9**:837-839.
7. **Arita I, Gispén R, Kalter SS, Wah LT, Marennikova SS, Netter R, Tagaya I.** 1972. Outbreaks of monkeypox and serological surveys in nonhuman primates. *Bull World Health Organ* **46**:625-631.
8. **Armstrong JA, Metz DH, Young MR.** 1973. The mode of entry of vaccinia virus into L cells. *J Gen Virol* **21**:533-537.
9. **Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G.** 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**:25-29.
10. **Atienza JM, Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi Y.** 2005. Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. *J Biomol Screen* **10**:795-805.
11. **Badrichani AZ, Stroka DM, Bilbao G, Curiel DT, Bach FH, Ferran C.** 1999. Bcl-2 and Bcl-XL serve an anti-inflammatory function in endothelial cells through inhibition of NF-kappaB. *J Clin Invest* **103**:543-553.
12. **Baggiolini M, Clark-Lewis I.** 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* **307**:97-101.
13. **Baldick CJ, Jr., Moss B.** 1993. Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes. *J Virol* **67**:3515-3527.
14. **Baxby D, Bennett M, Getty B.** 1994. Human cowpox 1969-93: a review based on 54 cases. *Br J Dermatol* **131**:598-607.
15. **Becker Y, Sprecher E.** 1989. Langerhans cells in vaccinia virus infection in mouse skin. *Arch Virol* **107**:307-313.
16. **Bennett M, Gaskell RM, Gaskell CJ, Baxby D, Kelly DF.** 1989. Studies on poxvirus infection in cats. *Arch Virol* **104**:19-33.
17. **Bhanuprakash V, Venkatesan G, Balamurugan V, Hosamani M, Yogisharadhya R, Gandhale P, Reddy KV, Damle AS, Kher HN, Chandel BS, Chauhan HC, Singh RK.** 2010. Zoonotic infections of buffalopox in India. *Zoonoses Public Health* **57**:e149-155.
18. **Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman WH, Pages F, Trajanoski Z, Galon J.** 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* **25**:1091-1093.
19. **Birthistle K, Carrington D.** 1997. Molluscum contagiosum virus. *J Infect* **34**:21-28.
20. **Boone RF, Moss B.** 1978. Sequence complexity and relative abundance of vaccinia virus mRNA's synthesized in vivo and in vitro. *J Virol* **26**:554-569.

21. **Borden KL, Freemont PS.** 1996. The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol* **6**:395-401.
22. **Bourquain D.** 2007. Modulation of Apoptosis by Orthopoxviruses. Master's thesis. Ruhr-University Bochum, Bochum.
23. **Bourquain D, Dabrowski PW, Nitsche A.** 2012. Comparison of host cell gene expression in cowpox, monkeypox or vaccinia virus-infected cells reveals virus-specific regulation of immune response genes. Robert Koch Institute, Berlin (eingereicht zur Publikation bei *Virology*, 15.08.2012, in Revision).
24. **Bourquain D, Nitsche A.** 2012. Cowpox virus but not Vaccinia virus induces secretion of CXCL1, IL-8 and IL-6 and chemotaxis of monocytes in vitro. Robert Koch Institute, Berlin (eingereicht zur Publikation bei *Virus Res.*, 16.08.2012, in Revision).
25. **Breman JG, Kalisa R, Steniowski MV, Zanotto E, Gromyko AI, Arita I.** 1980. Human monkeypox, 1970-79. *Bull World Health Organ* **58**:165-182.
26. **Brick DJ, Burke RD, Minkley AA, Upton C.** 2000. Ectromelia virus virulence factor p28 acts upstream of caspase-3 in response to UV light-induced apoptosis. *J Gen Virol* **81**:1087-1097.
27. **Brick DJ, Burke RD, Schiff L, Upton C.** 1998. Shope fibroma virus RING finger protein N1R binds DNA and inhibits apoptosis. *Virology* **249**:42-51.
28. **Broder CC, Kennedy PE, Michaels F, Berger EA.** 1994. Expression of foreign genes in cultured human primary macrophages using recombinant vaccinia virus vectors. *Gene* **142**:167-174.
29. **Broyles SS.** 2003. Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol* **84**:2293-2303.
30. **Broyles SS, Fesler BS.** 1990. Vaccinia virus gene encoding a component of the viral early transcription factor. *J Virol* **64**:1523-1529.
31. **Broyles SS, Moss B.** 1988. DNA-dependent ATPase activity associated with vaccinia virus early transcription factor. *J Biol Chem* **263**:10761-10765.
32. **Bruey JM, Bruey-Sedano N, Luciano F, Zhai D, Balpai R, Xu C, Kress CL, Bailly-Maitre B, Li X, Osterman A, Matsuzawa S, Tersikh AV, Faustin B, Reed JC.** 2007. Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* **129**:45-56.
33. **Brum LM, Lopez MC, Varela JC, Baker HV, Moyer RW.** 2003. Microarray analysis of A549 cells infected with rabbitpox virus (RPV): a comparison of wild-type RPV and RPV deleted for the host range gene, SPI-1. *Virology* **315**:322-334.
34. **Buchmeier NA, Gee SR, Murphy FA, Rawls WE.** 1979. Abortive replication of vaccinia virus in activated rabbit macrophages. *Infect Immun* **26**:328-338.
35. **Burns JM, Dairaghi DJ, Deitz M, Tsang M, Schall TJ.** 2002. Comprehensive mapping of poxvirus vCCI chemokine-binding protein. Expanded range of ligand interactions and unusual dissociation kinetics. *J Biol Chem* **277**:2785-2789.
36. **Buttner M, Rziha HJ.** 2002. Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**:7-16.
37. **Cacoullos N, Bablanian R.** 1993. Role of polyadenylated RNA sequences (POLADS) in vaccinia virus infection: correlation between accumulation of POLADS and extent of shut-off in infected cells. *Cell Mol Biol Res* **39**:657-664.
38. **Campe H, Zimmermann P, Glos K, Bayer M, Bergemann H, Dreweck C, Graf P, Weber BK, Meyer H, Buttner M, Busch U, Sing A.** 2009. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg Infect Dis* **15**:777-780.
39. **Carroll DS, Emerson GL, Li Y, Sammons S, Olson V, Frace M, Nakazawa Y, Czerny CP, Tryland M, Kolodziejek J, Nowotny N, Olsen-Rasmussen M, Khristova M, Govil D, Karem K, Damon IK, Meyer H.** 2011. Chasing Jenner's vaccine: revisiting cowpox virus classification. *PLoS One* **6**:e23086.
40. **Carter GC, Law M, Hollinshead M, Smith GL.** 2005. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J Gen Virol* **86**:1279-1290.
41. **Centers for Disease C, Prevention.** 2008. Laboratory-acquired vaccinia exposures and infections--United States, 2005-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **57**:401-404.

42. **Chang PY, Pogo BG.** 1993. Reintroduction of gene(s) into an attenuated deletion mutant of vaccinia virus strain IHD-W. *Microb Pathog* **15**:347-357.
43. **Chantrey J, Meyer H, Baxby D, Begon M, Bown KJ, Hazel SM, Jones T, Montgomery WI, Bennett M.** 1999. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol Infect* **122**:455-460.
44. **Chen N, Li G, Liszewski MK, Atkinson JP, Jahrling PB, Feng Z, Schriewer J, Buck C, Wang C, Lefkowitz EJ, Esposito JJ, Harms T, Damon IK, Roper RL, Upton C, Buller RM.** 2005. Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. *Virology* **340**:46-63.
45. **Chou W, Ngo T, Gershon PD.** 2012. An overview of the vaccinia virus infectome: a survey of the proteins of the poxvirus-infected cell. *J Virol* **86**:1487-1499.
46. **Clahsen T, Schaper F.** 2008. Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. *J Leukoc Biol* **84**:1521-1529.
47. **Clontech.** 2009. Yeast Protocols Handbook. Clontech Laboratories.
48. **Comeau MR, Johnson R, DuBose RF, Petersen M, Gearing P, VandenBos T, Park L, Farrah T, Buller RM, Cohen JI, Strockbine LD, Rauch C, Spriggs MK.** 1998. A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* **8**:473-482.
49. **Condit RC, Moussatche N, Traktman P.** 2006. In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv Virus Res* **66**:31-124.
50. **Cyrklaff M, Risco C, Fernandez JJ, Jimenez MV, Esteban M, Baumeister W, Carrascosa JL.** 2005. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:2772-2777.
51. **Czerny CP, Eis-Hubinger AM, Mayr A, Schneweis KE, Pfeiff B.** 1991. Animal poxviruses transmitted from cat to man: current event with lethal end. *Zentralbl Veterinarmed B* **38**:421-431.
52. **Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH.** 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **5**:e8668.
53. **Dales S, Milovanovitch V, Pogo BG, Weintraub SB, Huima T, Wilton S, McFadden G.** 1978. Biogenesis of vaccinia: isolation of conditional lethal mutants and electron microscopic characterization of their phenotypically expressed defects. *Virology* **84**:403-428.
54. **Damle AS, Gaikwad AA, Patwardhan NS, Duthade MM, Sheikh NS, Deshmukh DG.** 2011. Outbreak of human buffalopox infection. *J Glob Infect Dis* **3**:187-188.
55. **Damon IK.** 2011. Status of human monkeypox: clinical disease, epidemiology and research. *Vaccine* **29** Suppl 4:D54-59.
56. **Dasgupta A, Hammarlund E, Slifka MK, Fruh K.** 2007. Cowpox virus evades CTL recognition and inhibits the intracellular transport of MHC class I molecules. *J Immunol* **178**:1654-1661.
57. **de Freitas MH, de Oliveira LC, Mugge FL, Ferreira PC, Trindade Gde S, Kroon EG, Bonjardim CA.** 2011. The interplay between Aracatuba virus and host signaling pathways: role of PI3K/Akt in viral replication. *Arch Virol* **156**:1775-1785.
58. **de Souza Trindade G, Drumond BP, Guedes MI, Leite JA, Mota BE, Campos MA, da Fonseca FG, Nogueira ML, Lobato ZI, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG.** 2007. Zoonotic vaccinia virus infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. *J Clin Microbiol* **45**:1370-1372.
59. **Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ.** 2000. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**:351-361.
60. **Di Giulio DB, Eckburg PB.** 2004. Human monkeypox: an emerging zoonosis. *Lancet Infect Dis* **4**:15-25.
61. **Downie AW.** 1939. The Immunological Relationship of the Virus of spontaneous Cowpox to Vaccinia Virus. *Br J Exp Pathol* **20**:158-176.

62. **Droga-Mazovec G, Bojic L, Petelin A, Ivanova S, Romih R, Repnik U, Salvesen GS, Stoka V, Turk V, Turk B.** 2008. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem* **283**:19140-19150.
63. **Engelmayer J, Larsson M, Subklewe M, Chahroudi A, Cox WI, Steinman RM, Bhardwaj N.** 1999. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* **163**:6762-6768.
64. **Esposito J, Fenner F.** 2007. Poxviruses, p. 2947–2976. *In* D. M. Knipe (ed.), *Fields Virology*, 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
65. **Esposito JJ, Knight JC.** 1985. Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology* **143**:230-251.
66. **Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H.** 2010. Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol* **140**:229-236.
67. **Esteban DJ, Buller RM.** 2005. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. *J Gen Virol* **86**:2645-2659.
68. **Everett RD, Barlow P, Milner A, Luisi B, Orr A, Hope G, Lyon D.** 1993. A novel arrangement of zinc-binding residues and secondary structure in the C3HC4 motif of an alpha herpes virus protein family. *J Mol Biol* **234**:1038-1047.
69. **Ewing RM, Chu P, Elisma F, Li H, Taylor P, Climie S, McBroom-Cerajewski L, Robinson MD, O'Connor L, Li M, Taylor R, Dharsee M, Ho Y, Heilbut A, Moore L, Zhang S, Ornatsky O, Bukhman YV, Ethier M, Sheng Y, Vasilescu J, Abu-Farha M, Lambert JP, Duewel HS, Stewart, II, Kuehl B, Hogue K, Colwill K, Gladwish K, Muskat B, Kinach R, Adams SL, Moran MF, Morin GB, Topaloglou T, Figeys D.** 2007. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* **3**:89.
70. **Faustin B, Chen Y, Zhai D, Le Negrat G, Lartigue L, Satterthwait A, Reed JC.** 2009. Mechanism of Bcl-2 and Bcl-X(L) inhibition of NLRP1 inflammasome: loop domain-dependent suppression of ATP binding and oligomerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:3935-3940.
71. **Fenner F.** 1993. Smallpox: emergence, global spread, and eradication. *Hist Philos Life Sci* **15**:397-420.
72. **Fenner F, Anderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z. & Ladnyi, I. D.** 1988. *Smallpox and Its Eradication*. World Health Organization, Geneva.
73. **Freemont PS.** 1993. The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann N Y Acad Sci* **684**:174-192.
74. **Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J.** 1991. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* **64**:483-484.
75. **Gershon PD, Moss B.** 1990. Early transcription factor subunits are encoded by vaccinia virus late genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:4401-4405.
76. **Gileva IP, Nepomnyashchikh TS, Antonets DV, Lebedev LR, Kochneva GV, Grazhdantseva AV, Shchelkunov SN.** 2006. Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different. *Biochim Biophys Acta* **1764**:1710-1718.
77. **Gonzalez-Garcia M, Perez-Ballesteros R, Ding L, Duan L, Boise LH, Thompson CB, Nunez G.** 1994. bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development* **120**:3033-3042.
78. **Green MR, Sambrook J, Sambrook J.** 2012. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
79. **Gubser C, Hue S, Kellam P, Smith GL.** 2004. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* **85**:105-117.
80. **Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Conde R, Pascual-Montano A, Harshman K, Esteban M.** 2004. Microarray analysis reveals characteristic changes of host cell gene expression in response to attenuated modified vaccinia virus Ankara infection of human HeLa cells. *J Virol* **78**:5820-5834.
81. **Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Pascual-Montano A, Munoz M, Harshman K, Esteban M.** 2003. Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. *J Virol* **77**:6493-6506.

82. **Gurav YK, Raut CG, Yadav PD, Tandale BV, Sivaram A, Pore MD, Basu A, Mourya DT, Mishra AC.** 2011. Buffalopox outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India. *Prev Vet Med* **100**:242-247.
83. **Hendrickson RC, Wang C, Hatcher EL, Lefkowitz EJ.** 2010. Orthopoxvirus genome evolution: the role of gene loss. *Viruses* **2**:1933-1967.
84. **Henkels KM, Frondorf K, Gonzalez-Mejia ME, Doseff AL, Gomez-Cambronero J.** 2011. IL-8-induced neutrophil chemotaxis is mediated by Janus kinase 3 (JAK3). *FEBS Lett* **585**:159-166.
85. **Hergovich A, Stegert MR, Schmitz D, Hemmings BA.** 2006. NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:253-264.
86. **Hernando RA, Ruby JC, Halliday GM.** 1994. Changes in epidermal Langerhans cells, gamma delta T cells and CD4 T cells after intradermal infection with recombinant vaccinia virus expressing cytokine genes. *Immunol Cell Biol* **72**:383-389.
87. **Hierholzer JC, Killington RA.** 1996. Virus isolation and quantitation. In B. W. J. Mahy, H. O. Kangro (ed.), *Virology Methods Manual*. Academic Press Limited, London.
88. **Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, Van Damme J, Kusuda J, Tei H, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Yoshie O, Nomiyama H.** 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem* **272**:5846-5853.
89. **Hirayama A, Adachi R, Otani S, Kasahara T, Suzuki K.** 2007. Cofilin plays a critical role in IL-8-dependent chemotaxis of neutrophilic HL-60 cells through changes in phosphorylation. *J Leukoc Biol* **81**:720-728.
90. **Hjerno K, Hojrup P.** 2007. Calibration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight peptide mass fingerprinting spectra. *Methods Mol Biol* **367**:49-60.
91. **Hosamani M, Scagliarini A, Bhanuprakash V, McInnes CJ, Singh RK.** 2009. Orf: an update on current research and future perspectives. *Expert Rev Anti Infect Ther* **7**:879-893.
92. **Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ.** 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3668-3672.
93. **Huang J, Huang Q, Zhou X, Shen MM, Yen A, Yu SX, Dong G, Qu K, Huang P, Anderson EM, Daniel-Issakani S, Buller RM, Payan DG, Lu HH.** 2004. The poxvirus p28 virulence factor is an E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **279**:54110-54116.
94. **Huemer HP, Lassnig C, Nowotny N.** 2012. Cowpox virus isolate virulent in humans shows attenuated phenotype in mice. *Res Vet Sci* **92**:333-337.
95. **Humlova Z, Vokurka M, Esteban M, Melkova Z.** 2002. Vaccinia virus induces apoptosis of infected macrophages. *J Gen Virol* **83**:2821-2832.
96. **Hutchens M, Luker KE, Sottile P, Sonstein J, Lukacs NW, Nunez G, Curtis JL, Luker GD.** 2008. TLR3 increases disease morbidity and mortality from vaccinia infection. *J Immunol* **180**:483-491.
97. **Hutchens MA, Luker KE, Sonstein J, Nunez G, Curtis JL, Luker GD.** 2008. Protective effect of Toll-like receptor 4 in pulmonary vaccinia infection. *PLoS Pathog* **4**:e1000153.
98. **International Committee on Taxonomy of Viruses., King AMQ.** 2012. Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, London ; Waltham, MA.
99. **Iyer LM, Koonin EV, Aravind L.** 2002. Extensive domain shuffling in transcription regulators of DNA viruses and implications for the origin of fungal APSES transcription factors. *Genome Biol* **3**:RESEARCH0012.
100. **Jenne L, Hauser C, Arrighi JF, Saurat JH, Hugin AW.** 2000. Poxvirus as a vector to transduce human dendritic cells for immunotherapy: abortive infection but reduced APC function. *Gene Ther* **7**:1575-1583.
101. **Jezek Z, Gromyko AI, Szczeniowski MV.** 1983. Human monkeypox. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* **27**:13-28.

102. **Johnson RF, Dyal J, Ragland DR, Huzella L, Byrum R, Jett C, St Claire M, Smith AL, Paragas J, Blaney JE, Jahrling PB.** 2011. Comparative analysis of monkeypox virus infection of cynomolgus macaques by the intravenous or intrabronchial inoculation route. *J Virol* **85**:2112-2125.
103. **Johnson RF, Yellayi S, Cann JA, Johnson A, Smith AL, Paragas J, Jahrling PB, Blaney JE.** 2011. Cowpox virus infection of cynomolgus macaques as a model of hemorrhagic smallpox. *Virology* **418**:102-112.
104. **Johnston JB, Barrett JW, Nazarian SH, Goodwin M, Ricciuto D, Wang G, McFadden G.** 2005. A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. *Immunity* **23**:587-598.
105. **Johnston JB, McFadden G.** 2003. Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. *J Virol* **77**:6093-6100.
106. **Kalthoff D, Konig P, Meyer H, Beer M, Hoffmann B.** 2011. Experimental cowpox virus infection in rats. *Vet Microbiol* **153**:382-386.
107. **Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C.** 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* **24**:25-29.
108. **Karupiah G, Buller RM, Van Rooijen N, Duarte CJ, Chen J.** 1996. Different roles for CD4+ and CD8+ T lymphocytes and macrophage subsets in the control of a generalized virus infection. *J Virol* **70**:8301-8309.
109. **Kawai T, Akira S.** 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**:373-384.
110. **Kiyotaki C, Bloom BR.** 1984. Activation of murine macrophage cell lines. Possible involvement of protein kinases in stimulation of superoxide production. *J Immunol* **133**:923-931.
111. **Kohler RS, Schmitz D, Cornils H, Hemmings BA, Hergovich A.** 2010. Differential NDR/LATS interactions with the human MOB family reveal a negative role for human MOB2 in the regulation of human NDR kinases. *Mol Cell Biol* **30**:4507-4520.
112. **Kroon EG, Mota BE, Abrahao JS, da Fonseca FG, de Souza Trindade G.** 2011. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: from field to therapy. *Antiviral Res* **92**:150-163.
113. **Kurth A, Wibbelt G, Gerber HP, Petschaelis A, Pauli G, Nitsche A.** 2008. Rat-to-elephant-to-human transmission of cowpox virus. *Emerg Infect Dis* **14**:670-671.
114. **Lakics V, Medvedev AE, Okada S, Vogel SN.** 2000. Inhibition of LPS-induced cytokines by Bcl-xL in a murine macrophage cell line. *J Immunol* **165**:2729-2737.
115. **Lane JM, Poland GA.** 2011. Why not destroy the remaining smallpox virus stocks? *Vaccine* **29**:2823-2824.
116. **Langland JO, Kash JC, Carter V, Thomas MJ, Katze MG, Jacobs BL.** 2006. Suppression of proinflammatory signal transduction and gene expression by the dual nucleic acid binding domains of the vaccinia virus E3L proteins. *J Virol* **80**:10083-10095.
117. **Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J, Tessarollo L, Swing DA, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG.** 2001. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**:56-65.
118. **Lehmann MH, Kastenmuller W, Kandemir JD, Brandt F, Suezer Y, Sutter G.** 2009. Modified vaccinia virus ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression. *J Virol* **83**:2540-2552.
119. **Leonard EJ, Yoshimura T.** 1990. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* **11**:97-101.
120. **Lewis-Jones S.** 2004. Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr Opin Infect Dis* **17**:81-89.
121. **Li Y, Carroll DS, Gardner SN, Walsh MC, Vitalis EA, Damon IK.** 2007. On the origin of smallpox: correlating variola phylogenies with historical smallpox records. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:15787-15792.



122. **Likos AM, Sammons SA, Olson VA, Frace AM, Li Y, Olsen-Rasmussen M, Davidson W, Galloway R, Khristova ML, Reynolds MG, Zhao H, Carroll DS, Curns A, Formenty P, Esposito JJ, Regnery RL, Damon IK.** 2005. A tale of two clades: monkeypox viruses. *J Gen Virol* **86**:2661-2672.
123. **Ling MT, Chiu YT, Lee TK, Leung SC, Fung MK, Wang X, Wong KF, Wong YC.** 2008. Id-1 induces proteasome-dependent degradation of the HBX protein. *J Mol Biol* **382**:34-43.
124. **Liszewski MK, Leung MK, Hauhart R, Buller RM, Bertram P, Wang X, Rosengard AM, Kotwal GJ, Atkinson JP.** 2006. Structure and regulatory profile of the monkeypox inhibitor of complement: comparison to homologs in vaccinia and variola and evidence for dimer formation. *J Immunol* **176**:3725-3734.
125. **Liu X, Pan Z, Zhang L, Sun Q, Wan J, Tian C, Xing G, Yang J, Liu X, Jiang J, He F.** 2008. JAB1 accelerates mitochondrial apoptosis by interaction with proapoptotic BclGs. *Cell Signal* **20**:230-240.
126. **Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K.** 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* **4**:357-362.
127. **Lovering R, Hanson IM, Borden KL, Martin S, O'Reilly NJ, Evan GI, Rahman D, Pappin DJ, Trowsdale J, Freemont PS.** 1993. Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:2112-2116.
128. **Lu C, Bablanian R.** 1996. Characterization of small nontranslated polyadenylated RNAs in vaccinia virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2037-2042.
129. **Ludwig H, Mages J, Staib C, Lehmann MH, Lang R, Sutter G.** 2005. Role of viral factor E3L in modified vaccinia virus ankara infection of human HeLa Cells: regulation of the virus life cycle and identification of differentially expressed host genes. *J Virol* **79**:2584-2596.
130. **Martinez J, Huang X, Yang Y.** 2010. Toll-like receptor 8-mediated activation of murine plasmacytoid dendritic cells by vaccinia viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:6442-6447.
131. **Martinon F, Tschopp J.** 2005. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* **26**:447-454.
132. **McFadden G.** 2010. Killing a killer: what next for smallpox? *PLoS Pathog* **6**:e1000727.
133. **McFadden G.** 2005. Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* **3**:201-213.
134. **McFadden G, Kane K.** 1994. How DNA viruses perturb functional MHC expression to alter immune recognition. *Adv Cancer Res* **63**:117-209.
135. **Mercer AA, Schmidt A, Weber OF.** 2007. Poxviruses. Birkhäuser, Basel ; Boston.
136. **Mercer J, Helenius A.** 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**:531-535.
137. **Meyer H, Perrichot M, Stemmler M, Emmerich P, Schmitz H, Varaine F, Shungu R, Tshioko F, Formenty P.** 2002. Outbreaks of disease suspected of being due to human monkeypox virus infection in the Democratic Republic of Congo in 2001. *J Clin Microbiol* **40**:2919-2921.
138. **Meyer H, Schay C, Mahnel H, Pfeffer M.** 1999. Characterization of orthopoxviruses isolated from man and animals in Germany. *Arch Virol* **144**:491-501.
139. **Miller G, Enders JF.** 1968. Vaccinia virus replication and cytopathic effect in cultures in phytohemagglutinin-treated human peripheral blood leukocytes. *J Virol* **2**:787-792.
140. **Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H.** 2010. Pockenviren, p. 610-634, *Molekulare Virologie*, 3 ed. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Heidelberg.
141. **Mohamed MR, McFadden G.** 2009. NFkB inhibitors: strategies from poxviruses. *Cell Cycle* **8**:3125-3132.
142. **Moore ZS, Seward JF, Lane JM.** 2006. Smallpox. *Lancet* **367**:425-435.
143. **Moss B.** 2007. Poxviridae: the viruses and their replication, p. 2905–2946. *In* D. M. Knipe (ed.), *Fields Virology*, 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

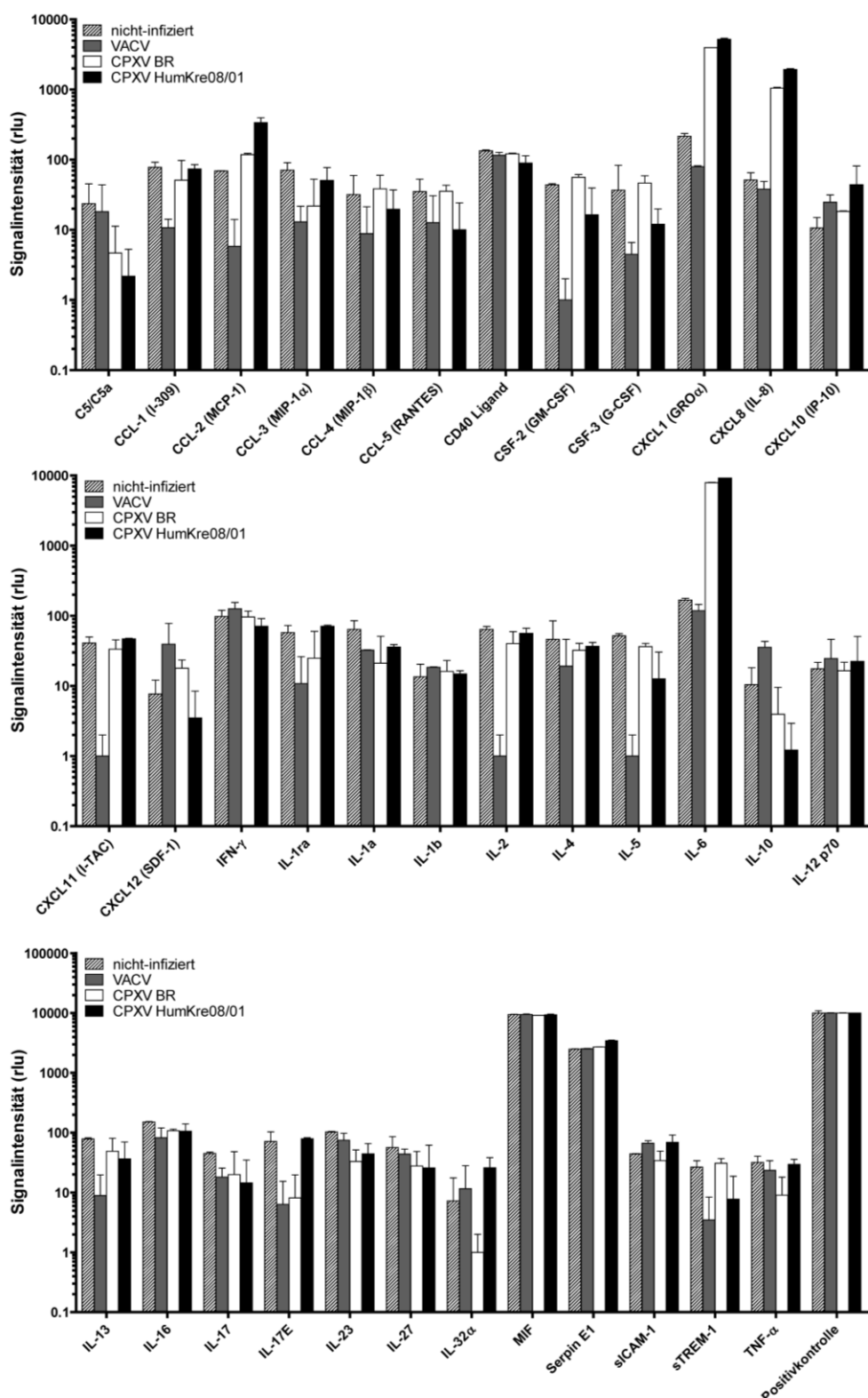
144. **Mottet K, Fruh K, Barry M.** 2010. The poxvirus encoded ubiquitin ligase p28 is dually regulated by ubiquitination, XVIII International Poxvirus, Asfivirus, and Iridovirus Symposium, Sedona, Arizona, USA.
145. **Moussatche N, Damaso CR, McFadden G.** 2008. When good vaccines go wild: Feral Orthopoxvirus in developing countries and beyond. *J Infect Dev Ctries* **2**:156-173.
146. **Mullis KB, Faloona FA.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-350.
147. **Myskiw C, Arsenio J, van Bruggen R, Deschambault Y, Cao J.** 2009. Vaccinia virus E3 suppresses expression of diverse cytokines through inhibition of the PKR, NF-kappaB, and IRF3 pathways. *J Virol* **83**:6757-6768.
148. **Nagao S, Inaba S, Iijima S.** 1976. Langerhans cells at the sites of vaccinia virus inoculation. *Arch Dermatol Res* **256**:23-31.
149. **Nasti TH, Timares L.** 2012. Inflammasome Activation of IL-1 Family Mediators in Response to Cutaneous Photodamage(dagger). *Photochem Photobiol* **88**:1111-1125.
150. **Nerenberg BT, Taylor J, Bartee E, Gouveia K, Barry M, Fruh K.** 2005. The poxviral RING protein p28 is a ubiquitin ligase that targets ubiquitin to viral replication factories. *J Virol* **79**:597-601.
151. **Ninove L, Domart Y, Vervel C, Voinot C, Salez N, Raoult D, Meyer H, Capek I, Zandotti C, Charrel RN.** 2009. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg Infect Dis* **15**:781-784.
152. **Nishmi M, Bernkopf H.** 1958. The toxic effect of vaccinia virus on leucocytes in vitro. *J Immunol* **81**:460-466.
153. **North RJ.** 1978. The concept of the activated macrophage. *J Immunol* **121**:806-809.
154. **Oda KI, Joklik WK.** 1967. Hybridization and sedimentation studies on "early" and "late" vaccinia messenger RNA. *J Mol Biol* **27**:395-419.
155. **Oehler L, Foedinger M, Koeller M, Kollars M, Reiter E, Bohle B, Skoupy S, Fritsch G, Lechner K, Geissler K.** 1997. Interleukin-10 inhibits spontaneous colony-forming unit-granulocyte-macrophage growth from human peripheral blood mononuclear cells by suppression of endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor release. *Blood* **89**:1147-1153.
156. **Oie KL, Pickup DJ.** 2001. Cowpox virus and other members of the orthopoxvirus genus interfere with the regulation of NF-kappaB activation. *Virology* **288**:175-187.
157. **Okada S, Zhang H, Hatano M, Tokuhisa T.** 1998. A physiologic role of Bcl-xL induced in activated macrophages. *J Immunol* **160**:2590-2596.
158. **Pedley S, Cooper RJ.** 1984. The inhibition of HeLa cell RNA synthesis following infection with vaccinia virus. *J Gen Virol* **65 ( Pt 10)**:1687-1697.
159. **Pelkonen PM, Tarvainen K, Hynninen A, Kallio ER, Henttonen K, Palva A, Vaheri A, Vapalahti O.** 2003. Cowpox with severe generalized eruption, Finland. *Emerg Infect Dis* **9**:1458-1461.
160. **Perdiguero B, Esteban M.** 2009. The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J Interferon Cytokine Res* **29**:581-598.
161. **Pickart CM, VanDemark AP.** 2000. Opening doors into the proteasome. *Nat Struct Biol* **7**:999-1001.
162. **Pickup DJ, Ink BS, Hu W, Ray CA, Joklik WK.** 1986. Hemorrhage in lesions caused by cowpox virus is induced by a viral protein that is related to plasma protein inhibitors of serine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:7698-7702.
163. **Rahman MM, Mohamed MR, Kim M, Smallwood S, McFadden G.** 2009. Co-regulation of NF-kappaB and inflammasome-mediated inflammatory responses by myxoma virus pyrin domain-containing protein M013. *PLoS Pathog* **5**:e1000635.
164. **Rathinam VA, Fitzgerald KA.** 2011. Innate immune sensing of DNA viruses. *Virology* **411**:153-162.
165. **Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ.** 1992. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* **69**:597-604.

166. **Rehm KE, Connor RF, Jones GJ, Yimbu K, Mannie MD, Roper RL.** 2009. Vaccinia virus decreases major histocompatibility complex (MHC) class II antigen presentation, T-cell priming, and peptide association with MHC class II. *Immunology* **128**:381-392.
167. **Rehm KE, Connor RF, Jones GJ, Yimbu K, Roper RL.** 2010. Vaccinia virus A35R inhibits MHC class II antigen presentation. *Virology* **397**:176-186.
168. **Reynolds MG, Damon IK.** 2012. Outbreaks of human monkeypox after cessation of smallpox vaccination. *Trends Microbiol.*
169. **Rice AP, Roberts BE.** 1983. Vaccinia virus induces cellular mRNA degradation. *J Virol* **47**:529-539.
170. **Riedel S.** 2005. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **18**:21-25.
171. **Rimoin AW, Mulembakani PM, Johnston SC, Lloyd Smith JO, Kisalu NK, Kinkela TL, Blumberg S, Thomassen HA, Pike BL, Fair JN, Wolfe ND, Shongo RL, Graham BS, Formenty P, Okitolonda E, Hensley LE, Meyer H, Wright LL, Muyembe JJ.** 2010. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:16262-16267.
172. **Rossi CR, Kiesel GK.** 1977. Susceptibility of bovine macrophage and tracheal-ring cultures to bovine viruses. *Am J Vet Res* **38**:1705-1708.
173. **Roth SJ, Hoper D, Beer M, Feineis S, Tischer BK, Osterrieder N.** 2011. Recovery of infectious virus from full-length cowpox virus (CPXV) DNA cloned as a bacterial artificial chromosome (BAC). *Vet Res* **42**:3.
174. **Rubins KH, Hensley LE, Relman DA, Brown PO.** 2011. Stunned silence: gene expression programs in human cells infected with monkeypox or vaccinia virus. *PLoS One* **6**:e15615.
175. **Saederup N, Lin YC, Dairaghi DJ, Schall TJ, Mocarski ES.** 1999. Cytomegalovirus-encoded beta chemokine promotes monocyte-associated viremia in the host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:10881-10886.
176. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
177. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-5467.
178. **Saurin AJ, Borden KL, Boddy MN, Freemont PS.** 1996. Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci* **21**:208-214.
179. **Schmidt FI, Bleck CK, Mercer J.** 2012. Poxvirus host cell entry. *Curr Opin Virol* **2**:20-27.
180. **Schumacher C, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B.** 1992. High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10542-10546.
181. **Seet BT, Johnston JB, Brunetti CR, Barrett JW, Everett H, Cameron C, Sypula J, Nazarian SH, Lucas A, McFadden G.** 2003. Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* **21**:377-423.
182. **Senkevich TG, Koonin EV, Buller RM.** 1994. A poxvirus protein with a RING zinc finger motif is of crucial importance for virulence. *Virology* **198**:118-128.
183. **Senkevich TG, Wolffe EJ, Buller RM.** 1995. Ectromelia virus RING finger protein is localized in virus factories and is required for virus replication in macrophages. *J Virol* **69**:4103-4111.
184. **Shchelkunov SN, Safronov PF, Totmenin AV, Petrov NA, Ryazankina OI, Gutorov VV, Kotwal GJ.** 1998. The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins. *Virology* **243**:432-460.
185. **Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M.** 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**:2856-2860.

186. **Silva PN, Soares JA, Brasil BS, Nogueira SV, Andrade AA, de Magalhaes JC, Bonjardim MB, Ferreira PC, Kroon EG, Bruna-Romero O, Bonjardim CA.** 2006. Differential role played by the MEK/ERK/EGR-1 pathway in orthopoxviruses vaccinia and cowpox biology. *Biochem J* **398**:83-95.
187. **Singh RK, Balamurugan V, Hosamani M, De UK, Chandra BM, Krishnappa MPG.** 2007. B5r gene based sequence analysis of Indian buffalopox virus isolates in relation to other orthopoxviruses. *Acta Virol* **51**:47-50.
188. **Singh RK, Hosamani M, Balamurugan V, Bhanuprakash V, Rasool TJ, Yadav MP.** 2007. Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis. *Anim Health Res Rev* **8**:105-114.
189. **Singh RK, Hosamani M, Balamurugan V, Satheesh CC, Rasool TJ, Yadav MP.** 2006. Comparative sequence analysis of envelope protein genes of Indian buffalopox virus isolates. *Arch Virol* **151**:1995-2005.
190. **Smith AL, St Claire M, Yellayi S, Bollinger L, Jahrling PB, Paragas J, Blaney JE, Johnson RF.** 2012. Intrabronchial inoculation of cynomolgus macaques with cowpox virus. *J Gen Virol* **93**:159-164.
191. **Smith CA, Smith TD, Smolak PJ, Friend D, Hagen H, Gerhart M, Park L, Pickup DJ, Torrance D, Mohler K, Schooley K, Goodwin RG.** 1997. Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits beta chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. *Virology* **236**:316-327.
192. **Smith DF, Galkina E, Ley K, Huo Y.** 2005. GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**:H1976-1984.
193. **Smith GL, Law M.** 2004. The exit of vaccinia virus from infected cells. *Virus Res* **106**:189-197.
194. **Smith GL, Murphy BJ, Law M.** 2003. Vaccinia virus motility. *Annu Rev Microbiol* **57**:323-342.
195. **Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T.** 2011. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* **27**:431-432.
196. **Soares JA, Leite FG, Andrade LG, Torres AA, De Sousa LP, Barcelos LS, Teixeira MM, Ferreira PC, Kroon EG, Souto-Padron T, Bonjardim CA.** 2009. Activation of the PI3K/Akt pathway early during vaccinia and cowpox virus infections is required for both host survival and viral replication. *J Virol* **83**:6883-6899.
197. **Spence J, Gali RR, Dittmar G, Sherman F, Karin M, Finley D.** 2000. Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* **102**:67-76.
198. **Spriggs MK, Hruby DE, Maliszewski CR, Pickup DJ, Sims JE, Buller RM, VanSlyke J.** 1992. Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. *Cell* **71**:145-152.
199. **Stanford MM, McFadden G.** 2005. The 'supervirus'? Lessons from IL-4-expressing poxviruses. *Trends Immunol* **26**:339-345.
200. **Stutz A, Golenbock DT, Latz E.** 2009. Inflammasomes: too big to miss. *J Clin Invest* **119**:3502-3511.
201. **Taylor JM, Barry M.** 2006. Near death experiences: poxvirus regulation of apoptotic death. *Virology* **344**:139-150.
202. **Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ.** 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:231-241.
203. **Thomassen MJ, Raychaudhuri B, Bonfield TL, Malur A, Abraham S, Barna BP, Kavuru MS.** 2003. Elevated IL-10 inhibits GM-CSF synthesis in pulmonary alveolar proteinosis. *Autoimmunity* **36**:285-290.
204. **Tischer BK, Smith GA, Osterrieder N.** 2010. En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol Biol* **634**:421-430.
205. **Tolonen N, Doglio L, Schleich S, Krijnse Locker J.** 2001. Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol Biol Cell* **12**:2031-2046.
206. **Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL.** 2000. Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol* **18**:861-926.
207. **Trindade GS, Emerson GL, Carroll DS, Kroon EG, Damon IK.** 2007. Brazilian vaccinia viruses and their origins. *Emerg Infect Dis* **13**:965-972.

208. **Trindade GS, Guedes MI, Drumond BP, Mota BE, Abrahao JS, Lobato ZI, Gomes JA, Correa-Oliveira R, Nogueira ML, Kroon EG, da Fonseca FG.** 2009. Zoonotic vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin Infect Dis* **48**:e37-40.
209. **Trindade GS, Lobato ZI, Drumond BP, Leite JA, Trigueiro RC, Guedes MI, da Fonseca FG, dos Santos JR, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG.** 2006. Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Am J Trop Med Hyg* **75**:486-490.
210. **Upton C, Schiff L, Rice SA, Dowdeswell T, Yang X, McFadden G.** 1994. A poxvirus protein with a RING finger motif binds zinc and localizes in virus factories. *J Virol* **68**:4186-4195.
211. **Upton C, Slack S, Hunter AL, Ehlers A, Roper RL.** 2003. Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. *J Virol* **77**:7590-7600.
212. **Vanderplassen A, Smith GL.** 1997. A novel virus binding assay using confocal microscopy: demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors. *J Virol* **71**:4032-4041.
213. **Venkatesan G, Balamurugan V, Prabhu M, Yogisharadhya R, Bora DP, Gandhale PN, Sankar MS, Kulkarni AM, Singh RK, Bhanuprakash V.** 2010. Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: a severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Vet Ital* **46**:439-448.
214. **Wahl-Jensen V, Cann JA, Rubins KH, Huggins JW, Fisher RW, Johnson AJ, de Kok-Mercado F, Larsen T, Raymond JL, Hensley LE, Jahrling PB.** 2011. Progression of pathogenic events in cynomolgus macaques infected with variola virus. *PLoS One* **6**:e24832.
215. **Welss T, Sun J, Irving JA, Blum R, Smith AI, Whisstock JC, Pike RN, von Mikecz A, Ruzicka T, Bird PI, Abts HF.** 2003. Hurpin is a selective inhibitor of lysosomal cathepsin L and protects keratinocytes from ultraviolet-induced apoptosis. *Biochemistry* **42**:7381-7389.
216. **Weng L, Dai H, Zhan Y, He Y, Stepaniants SB, Bassett DE.** 2006. Rosetta error model for gene expression analysis. *Bioinformatics* **22**:1111-1121.
217. **Werden SJ, Rahman MM, McFadden G.** 2008. Poxvirus host range genes. *Adv Virus Res* **71**:135-171.
218. **White C, Li C, Yang J, Petrenko NB, Madesh M, Thompson CB, Foskett JK.** 2005. The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. *Nat Cell Biol* **7**:1021-1028.
219. **WHO.** 2011. WHO Advisory Committee on Variola Virus Research, Report of the Thirteenth Meeting. World Health Organization.
220. **WHO.** 1978. WHO Weekly Epidemiological Report. World Health Organization.
221. **Witkowski PT, Schuenadel L, Wiethaus J, Bourquain DR, Kurth A, Nitsche A.** 2010. Cellular impedance measurement as a new tool for poxvirus titration, antibody neutralization testing and evaluation of antiviral substances. *Biochem Biophys Res Commun* **401**:37-41.
222. **Yadav S, Hosamani M, Balamurugan V, Bhanuprakash V, Singh RK.** 2010. Partial genetic characterization of viruses isolated from pox-like infection in cattle and buffaloes: evidence of buffalo pox virus circulation in Indian cows. *Arch Virol* **155**:255-261.
223. **Yang Z, Bruno DP, Martens CA, Porcella SF, Moss B.** 2010. Simultaneous high-resolution analysis of vaccinia virus and host cell transcriptomes by deep RNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:11513-11518.
224. **Yutin N, Wolf YI, Raoult D, Koonin EV.** 2009. Eukaryotic large nucleo-cytoplasmic DNA viruses: clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. *Virol J* **6**:223.
225. **Zhu J, Martinez J, Huang X, Yang Y.** 2007. Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN-beta. *Blood* **109**:619-625.

## 9. Anhang



**Abbildung 35: Relative Quantifizierung der Cytokin-Konzentrationen im Überstand von VACV-, CPXV BR-, CPXV HumKre08/01-, oder nicht-infizierten Zellen (jeweils 6 h p.i.).** Vollständige Darstellung aller gemessenen Cytokine (vgl. Abb. 12). Zum Vergleich der Datensätze wurden die gemessenen Signalintensitäten auf die Werte der jeweiligen Positivkontrollen normalisiert. Insbesondere CXCL1, IL-6 und IL-8 werden stark nach CPXV BR- und HumKre08/01-, nicht jedoch nach VACV-Infektion sekretiert.